

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Analítica y Análisis Instrumental

**NANOESTRUCTURAS DE CARBONO Y DE ÓXIDO DE ZINC
COMO BASE PARA EL DESARROLLO DE MÉTODOS DE
DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES DE
ENFERMEDADES METABÓLICAS**

MARÍA BRIONES LLAGUNO

MADRID, 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA Y ANÁLISIS INSTRUMENTAL



**NANOESTRUCTURAS DE CARBONO Y DE ÓXIDO DE ZINC COMO
BASE PARA EL DESARROLLO DE MÉTODOS DE DETERMINACIÓN
DE BIOMARCADORES DE ENFERMEDADES METABÓLICAS**

María Briones Llaguno

Tesis Doctoral

Madrid, Diciembre de 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA Y ANÁLISIS INSTRUMENTAL



**NANOESTRUCTURAS DE CARBONO Y DE ÓXIDO DE ZINC COMO
BASE PARA EL DESARROLLO DE MÉTODOS DE DETERMINACIÓN
DE BIOMARCADORES DE ENFERMEDADES METABÓLICAS**

Memoria que presenta la licenciada

María Briones Llaguno

para optar al grado de Doctor

Dña. María Encarnación Lorenzo Abad, Doctora en Ciencias Químicas y Catedrática del Departamento de Química Analítica y Análisis Instrumental de la Universidad Autónoma de Madrid, y D. Félix Pariente Alonso, Doctor en Ciencias Químicas y Profesor Titular del mismo departamento:

Informamos que la presente memoria, titulada: “Nanoestructuras de carbono y de óxido de zinc como base para el desarrollo de métodos de determinación de biomarcadores de enfermedades metabólicas” ha sido desarrollada por Dña. María Briones Llaguno en el Departamento de Química Analítica y Análisis Instrumental de la Universidad Autónoma de Madrid, bajo mi dirección.

Asimismo, hacemos constar que el trabajo descrito en dicha memoria reúne, en nuestra opinión, todos los requisitos para su defensa y aprobación, por lo que, como directores del trabajo de investigación, autorizamos su presentación para que pueda ser defendida por el doctorando como Tesis Doctoral en acto público en el Departamento de Química Analítica y Análisis Instrumental de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste firmamos el presente documento en Madrid, a 6 de noviembre de 2018.

Fdo. M^a Encarnación Lorenzo Abad

Fdo. Félix Pariente Alonso

Agradecimientos

Quisiera agradecer, en primer lugar, a mis directores de tesis, la Dra. M^a Encarnación Lorenzo y Dr. Félix Pariente, por sus conocimientos, interés y dedicación en el desarrollo de esta tesis.

También, al Ministerior de Economía y Competitividad por la concesión de un contrato FPI para la realización de esta tesis doctoral, así como a la Comunidad de Madrid por la financiación de un contrato de investigación.

A todas las personas que han participado en el desarrollo de este trabajo de tesis, Elena Casero, M^a Dolores Petit y Ana Parra.

A Luis Vázquez, del Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid (CSIC) de la Universidad Autónoma de Madrid, por su ayuda con las medidas de AFM.

Al grupo del Porfesor José Luis Pau, del Departamento de Física Aplicada de la Universidad Autónoma de Madrid, por su colaboración, que ha permitido el desarrollo de parte de esta tesis. En concreto a Sergio, por el trabajo y las horas compartidas.

A Mónica y Tania, por vuestra ayuda y apoyo.

Como no, a Iria, Emiliano, Cesar, Marta, Abraham, por todos los buenos momentos que hemos pasado, y los que nos quedan. Por tantas risas.

Quisiera agradecer en especial a mi familia.

A Fer, por contagiarnos su vitalidad y darnos siempre su apoyo incondicional.

A Nico, por tu paciencia, comprensión, tu cariño y tu apoyo constante. Por compartir y crear conmigo los mejores momentos, por no soltar mi mano en los peores. Por ser el mejor compañero de viaje.

A mi hermano, por ser como eres. Por apoyarme, por cuidarme, siempre.

A mis padres, por serlo todo, mi trampolín y mi red, mi pilar. Por haberme dado todo. Por estar, siempre y para siempre, a mi lado.

A mi padre

ÍNDICE

RESUMEN/ABSTRACT	1
INTRODUCCIÓN	15
1. BIOSENSORES	17
1.1. Definición y clasificación	17
1.2. Estrategias de inmovilización del agente de reconocimiento biológico	22
1.3. Integración de nanomateriales en el desarrollo de biosensores	25
1.3.1. Definición y clasificación de nanomateriales	26
1.3.2. Propiedades de los nanomateriales	26
1.3.3. Nanomateriales de carbono. Nanopartículas de diamante (DNPs)	28
1.3.4. Otros nanomateriales. Óxido de zinc (ZnO)	39
1.4. Aplicación de biosensores a la determinación de analitos de interés	46
1.4.1. Glucosa	46
1.4.2. Lactato	50
2. MÉTODOS ÓPTICOS PARA LA DETECCIÓN DE LACTATO	55
3. ELECTROQUÍMICA BIPOLAR (BPE)	58
OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO	65
MATERIALES Y MÉTODOS	69
1. REACTIVOS, DISOLUCIONES Y DISPERSIONES	71
1.1. Reactivos comerciales	71
1.2. Reactivos de síntesis	72
1.3. Disoluciones	72
1.4. Dispersiones	74
1.5. Preparación de sol-gel empleando MPTS como precursor	75
1.6. Preparación de DNPsB y H ₂ AuCl ₄ en gel de agarosa 1.4% (w/v)	76
1.7. Muestras reales	76
2. MATERIALES	76

2.1. Electrodo empleados	76
2.2. Celdas empleadas.....	77
2.3. Soporte para la caracterización mediante microscopía de fuerza atómica (AFM)	78
2.4. Soporte para la caracterización mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)	78
2.5. Soporte para medidas de espectroscopía Raman.....	78
3. TÉCNICAS Y EQUIPOS EMPLEADOS	79
3.1. Técnicas electroquímicas	79
3.1.1. Voltamperometría cíclica (CV).....	79
3.1.2. Voltamperometría diferencial de impulsos (DPV).....	79
3.1.3. Cronoamperometría	80
3.1.4. Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS).....	81
3.1.5. Electroquímica bipolar-UV (BP-UV)	84
3.2. Técnicas de caracterización superficial	86
3.2.1. Microscopía de Fuerzas Atómicas (AFM)	86
3.2.2. Microscopía de fuerza Kelvin (KFM)	89
3.2.3. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	90
3.3. Técnicas espectroscópicas	91
3.3.1. Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)	91
3.3.2. Espectroscopía Raman.....	92
3.3.3. Espectroscopía de fluorescencia	93
3.4. Caracterización mediante potencial Zeta (ζ)	94
3.5. Otros equipos empleados	94
4. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	95
4.1. Pretratamiento de los electrodos de oro	95
4.2. Activación de los electrodos de oro	95

4.3. Desarrollo del biosensor Enzima/DNPs/Au.....	95
4.3.1. Modificación de electrodos con nanopartículas de diamante (DNPs/Au)	95
4.3.2. Modificación del electrodo DNPs/Au con la enzima (Enzima/DNPs/Au)	96
4.3.3. Modificación de electrodos con glucosa o lactato oxidasa (GOx/Au o LOx/Au)	96
4.4. Desarrollo del biosensor Enzima/DNPs9/MPTS/Au	96
4.4.1. Modificación de electrodos con MPTS (MPTS/Au).....	96
4.4.2. Modificación del electrodo MPTS/Au con DNPs9 (DNPs9/MPTS/Au)....	96
4.4.3. Modificación de DNPs9/MPTS/Au con la enzima (Enzima/DNPs9/MPTS/Au)	97
4.5. Caracterización morfológica.....	97
4.5.1. Caracterización del sistema Enzima/DNPs9/Au mediante SEM.....	97
4.5.2. Caracterización de los ZnO NWs mediante SEM	97
4.5.3. Caracterización del sistema Enzima/DNPs/Au mediante AFM	97
4.5.4. Caracterización del sistema LOx/DNPs9/MPTS/Au mediante AFM	98
4.5.5. Caracterización de las DNPsB mediante AFM	98
4.6. Determinación del tamaño de las DNPs mediante AFM.....	98
4.7. Caracterización de la superficie Enzima/DNPs/Au mediante espectroscopía Raman	99
4.8. Caracterización de la superficie MPTS/Au mediante espectroscopía de infrarrojo	99
4.9. Medidas electroquímicas	99
4.10. Determinación de lactato en muestra real	100
4.11. Determinación de lactato mediante el kit enzimático	101
4.12. Electroquímica bipolar aplicada a partículas de carbono	102
4.13. Electroquímica bipolar combinada con radiación UV (BPE&UV)	102

4.14. Preparación del bioconjugado ZnO NWs-LOx para la determinación de lactato	103
4.15. Medidas de lactato mediante bioensayo óptico basado en ZnO NWs	103
5. CÁLCULO DE PARÁMETROS Y CONSTANTES DE INTERÉS.....	103
5.1. Cálculo de la constante catalítica mediante el método de Galus	103
5.2. Deconvolución de bandas de los espectros Raman	104
5.3. Cálculo de la constante cinética de la reacción enzimática (K_M).....	105
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	107
CAPÍTULO 1: BIOSENSORES BASADOS EN ELECTRODOS DE ORO NANOESTRUCTURADOS CON NANOPARTÍCULAS DE DIAMANTE (DNPs)	109
1.1 Caracterización de las nanopartículas de diamante (DNPs) empleadas en la nanoestructuración de electrodos de oro.....	111
1.1.1. Caracterización de las DNPs	113
1.1.1.1. Caracterización morfológica de las DNPs mediante SEM.....	113
1.1.1.2. Caracterización morfológica de las DNPs mediante AFM.	
Determinación del tamaño	113
1.1.1.3. Caracterización de las DNPs mediante espectroscopía Raman	116
1.1.1.4. Caracterización de las DNPs mediante espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR).....	118
1.1.1.5. Caracterización de las DNPs mediante medida del potencial Zeta ..	119
1.1.2. Caracterización electroquímica de las DNPs	121
1.1.2.1. Caracterización de las DNPs mediante voltamperometría diferencial de impulsos (DPV)	121
1.1.2.2. Caracterización de las DNPs mediante voltamperometría cíclica (CV) ..	
.....	122

1.1.2.3. Comportamiento electroquímico de los electrodos de oro nanoestructurados con DNPs	123
1.1.2.4. Respuesta del prepico frente a pH	130
1.2 Biosensores 2D de glucosa o lactato basados en electrodos de oro nanoestructurados con nanopartículas de diamante de 9 nm	133
1.2.1. Desarrollo del biosensor de glucosa o lactato.....	135
1.2.2. Caracterización de las distintas etapas de desarrollo del biosensor.....	136
1.2.2.1. Caracterización morfológica mediante AFM	136
1.2.2.2. Caracterización morfológica mediante SEM	139
1.2.2.3. Caracterización mediante espectroscopia Raman	139
1.2.2.4. Caracterización electroquímica	141
1.2.3. Respuesta del biosensor de glucosa (GOx/DNPs9/Au)	143
1.2.3.1. Obtención de la curva de calibrado.....	147
1.2.3.2. Determinación de las propiedades analíticas del biosensor de glucosa (GOx/DNPs9/Au)	149
1.2.4. Respuesta del biosensor de lactato (LOx/DNPs9/Au)	151
1.2.4.1. Obtención de la curva de calibrado.....	153
1.2.4.2. Determinación de las propiedades analíticas del biosensor de lactato (LOx/DNPs9/Au).....	154
1.2.4.3. Respuesta del biosensor de lactato (LOx/DNPs9/Au) obtenida mediante cronoamperometría	157
1.2.5. Respuesta de los biosensores de glucosa (GOx/DNPs9/Au) y lactato (LOx/DNPs9/Au) obtenidas a velocidad de barrido 100 mV s ⁻¹	158
1.2.6. Cálculo de los parámetros y constantes de interés del biosensor de lactato (LOx/DNPs9/Au).....	161
1.2.6.1. Determinación de la constante catalítica para lactato (k).....	161

1.2.6.2. Cálculo de los parámetros cinéticos del biosensor de lactato (LOx/DNPs9/Au)	163
1.2.7. Aplicación del biosensor LOx/DNPs9/Au a la determinación de lactato en muestras reales.....	166
1.2.7.1. Estudio de interferentes.....	166
1.2.7.2. Determinación de lactato en vino blanco	167
1.2.7.3. Determinación de lactato en suero	168
1.3 Biosensores 2D de glucosa o lactato basados en electrodos de oro nanoestructurados con nanoparticulas de diamante de 4 nm	171
1.3.1. Desarrollo del biosensor de glucosa o lactato.....	173
1.3.2. Caracterización de las distintas etapas de desarrollo del biosensor.....	174
1.3.2.1. Caracterización morfológica mediante Raman	174
1.3.2.2. Caracterización electroquímica	175
1.3.3. Respuesta del biosensor de glucosa (GOx/DNPs4/Au)	177
1.3.3.1. Obtención de la curva de calibrado.....	178
1.3.3.2. Determinación de las propiedades analíticas del biosensor de glucosa (GOx/DNPs4/Au)	180
1.3.4. Respuesta del biosensor de lactato (LOx/DNPs4/Au)	182
1.3.4.1. Obtención de la curva de calibrado.....	183
1.3.4.2. Determinación de las propiedades analíticas del biosensor de lactato (LOx/DNPs4/Au)	185
1.3.4.3. Respuesta del biosensor de lactato (LOx/DNPs4/Au) frente a adición de lactato obtenida mediante cronoamperometría.....	187
1.3.5. Respuesta de los biosensores de glucosa (GOx/DNPs4/Au) y lactato (LOx/DNPs4/Au) obtenidos a velocidad de barrido 100 mV s ⁻¹	189

1.3.6. Cálculo de parámetros y constantes de interés del biosensor de lactato (LOx/DNPs4/Au).....	192
1.3.6.1. Determinación de la constante catalítica para lactato (k).....	192
1.3.6.2. Cálculo de los parámetros cinéticos del biosensor de lactato (LOx/DNPs4/Au).....	193
1.3.7. Aplicación del biosensor LOx/DNPs4/Au a la determinación de lactato en muestras reales.....	196
1.3.7.1. Estudio de interferentes.....	196
1.3.7.2. Determinación de lactato en vino blanco	196
1.3.7.3. Determinación de lactato en suero	197
1.4 Biosensor 3D de lactato basado en electrodos de oro modificados con nanopartículas de diamante con metodología sol-gel	199
1.4.1. Desarrollo del biosensor de lactato.....	201
1.4.2. Caracterización de las distintas etapas de desarrollo del biosensor.....	202
1.4.2.1. Caracterización de la superficie MPTS/Au mediante IR	202
1.4.2.2. Caracterización morfológica mediante AFM	203
1.4.2.3. Caracterización del biosensor mediante EIS.....	208
1.4.2.4. Caracterización del biosensor mediante CV	216
1.4.3. Respuesta del biosensor de lactato LOx/DNPs9/MPTS/Au frente a adición de sustrato.....	218
1.4.3.1. Obtención de la curva de calibrado.....	219
1.4.3.2. Determinación de las propiedades analíticas del biosensor LOx/DNPs9/MPTS/Au	221
1.4.4. Cálculo de los parámetros cinéticos del biosensor de lactato LOx/DNPs9/MPTS/Au	225

1.4.5. Aplicación del biosensor LOx/DNPs9/MPTS/Au a la determinación de lactato en muestras reales.....	226
1.4.5.1. Determinación de lactato en vino blanco	226
1.4.5.2. Determinación de lactato en suero	227

CAPÍTULO 2: MÉTODO ÓPTICO BASADO EN NANOHILOS DE ZnO PARA LA DETECCIÓN DE LACTATO..... 229

2.1. Método de síntesis de los nanohilos de ZnO (ZnO NWs).....	233
2.2. Caracterización de los ZnO NWs sintetizados	235
2.2.1. Caracterización morfológica mediante microscopía óptica	235
2.2.2. Caracterización morfológica mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)	236
2.2.3. Caracterización mediante espectroscopía de absorción UV visible	237
2.2.4. Caracterización mediante espectroscopía de fluorescencia	238
2.2.5. Caracterización mediante espectroscopía Raman	240
2.2.6. Estudio de la estabilidad de la fluorescencia de los ZnO NWs	243
2.3. Formación del bioconjugado ZnO NWs-LOx	244
2.3.1. Estudio de la interacción de los ZnO NWs con la enzima (LOx)	244
2.3.2. Optimización del tiempo de interacción de los ZnO NWs con la enzima (LOx)	247
2.3.3. Caracterización del bioconjugado mediante microscopía de fluorescencia	250
2.4. Respuesta del bioconjugado ZnO NWs-LOx frente la adición de lactato	252

CAPÍTULO 3: MODIFICACIÓN DE NANOESTRUCTURAS MEDIANTE ELECTROQUÍMICA BIPOLAR COMBINADA CON RADIACIÓN UV (BPE&UV) 257

3.1. Construcción de la celda empleada	260
3.2. Aplicación de BPE&UV sobre DNPsB.....	263

3.2.1. Caracterización morfológica de las DNPsB mediante AFM	263
3.2.2. Caracterización morfológica de las DNPsB mediante AFM tras la aplicación de BPE&UV.....	265
3.2.3. Caracterización morfológica de las DNPsB mediante SEM tras la aplicación de BPE&UV.....	269
3.3. Aplicación de BPE&UV para la modificación de ZnO NWs.....	274
3.3.1. Caracterización morfológica del proceso de modificación mediante SEM.....	274
3.3.3. Aplicación de BPE&UV sobre nanohilos de ZnO inmovilizados sobre mica	282
CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	287
BIBLIOGRAFÍA.....	295
PUBLICACIONES.....	329



RESUMEN/ABSTRACT

RESUMEN

El trabajo de tesis desarrollado tiene como objetivo principal la aplicación de distintos nanomateriales, en concreto nanopartículas de diamante (DNPs) y nanoestructuras de óxido de zinc (ZnO), en el desarrollo de biosensores electroquímicos 2 D y 3 D, y de métodos ópticos de análisis para la determinación de biomarcadores de interés, como la glucosa y el lactato. Además, se ha tratado de modificar estos nanomateriales de forma asimétrica mediante una novedosa técnica electroquímica, la electroquímica bipolar, combinada con radiación ultravioleta (BPE&UV), para la obtención de nanomateriales con diferente reactividad en su superficie (Janus).

Para el desarrollo de los biosensores 2D basados en la nanoestructuración de electrodos de oro con DNPs se han seguido distintas metodologías. En primer lugar, se desarrollaron biosensores basados en la inmovilización por adsorción directa tanto de las DNPs como de las enzimas, sobre electrodos de oro. En este caso se emplearon DNPs de distinto tamaño, de 9 nm (DNPs9) y de 4 nm (DNPs4), y como elemento de reconocimiento, la glucosa oxidasa o la lactato oxidasa.

Como paso previo, se trató de averiguar los grupos funcionales presentes en la superficie de los tipos de DNPs mediante espectroscopía de infrarrojo (IR), no existiendo gran diferencia entre ambos. A continuación, se estudió el comportamiento electroquímico de las DNPs adsorbidas sobre un electrodo de oro. Se comprobó que, aunque las DNPs tienen un carácter aislante, muestran actividad electrocatalítica como consecuencia de la presencia de grupos funcionales con insaturaciones en su superficie. Igualmente se estudió la respuesta de los electrodos modificados con DNPs a un mediador redox, el hidroximetil ferroceno (HMF). El electrodo modificado con las nanopartículas grandes (DNPs9/Au) mostró un proceso redox quasi reversible correspondiente a la oxidación-reducción del HMF a +0.30 V. Sin embargo, el modificado con las nanopartículas pequeñas

(DNPs4/Au), además de la respuesta redox característica del HMF a +0.30 V, mostró un proceso irreversible a un potencial de +0.15 V. Con el fin de estudiar el origen de este pico se obtuvieron los voltamperogramas cíclicos de DNPs4/Au en HMF a distintas velocidades de barrido de potencial. De los resultados obtenidos se concluyó que este pico irreversible se debe a un proceso de adsorción.

Se desarrollaron los biosensores de glucosa y lactato mediante inmovilización de la enzima (glucosa oxidasa o lactato oxidasa) sobre la plataforma electroquímica DNPs/Au mediante adsorción directa. Se caracterizaron las distintas etapas del desarrollo de los biosensores mediante espectroscopía Raman, AFM, SEM y voltamperometría cíclica. Posteriormente, se obtuvo la respuesta de los biosensores GOX/DNPs/Au y LOx/DNPs/Au desarrollados frente a la adición de glucosa y lactato, respectivamente, en presencia de un mediador redox en disolución, el hidroximetil ferroceno (HMF). El empleo del HMF permite reducir el sobrepotencial y evitar así posibles interferentes. Los biosensores desarrollados presentan una buena reproducibilidad y estabilidad con límites de detección de 61.6 μM y 15.0 μM , para glucosa y lactato respectivamente, y de 134.6 μM y 5.3 μM para los biosensores con las nanopartículas de 4 nm. En todos los casos los resultados alcanzados son comparables con los que se pueden encontrar en la bibliografía para biosensores de lactato y glucosa fabricados de forma similar. El biosensor LOx/DNPs4/Au permite trabajar a +0.15 V, un potencial bastante bajo, con la ventaja que esto supone a la hora de evitar posibles interferencias.

Por otro lado, se desarrolló un biosensor 3D basado en la integración de las nanopartículas de diamante, en este caso DNPs9, y el elemento de reconocimiento biológico, la LOx, en una red tridimensional de tipo sol-gel usando como precursor el 3-mercaptopropiltrimetoxisilano, MPTS (LOx/DNPs9/MPTS/Au). El uso del proceso sol-gel destaca como una forma de preparación de materiales porosos híbridos orgánico-inorgánicos, que permiten crear un entorno adecuado para

retener la estructura y actividad de la enzima encapsulada en ellos. Se realizó el estudio morfológico mediante AFM de todas las etapas de la modificación del electrodo. Posteriormente, se realizó también el estudio de la respuesta electroquímica frente a lactato en presencia de HMF, obteniéndose un límite de detección de 16 μM . Cabe destacar que, como era de esperar, en este caso, se obtiene una gran mejoría, del 50 %, en la estabilidad del biosensor al compararlo con los biosensores desarrollados previamente, modificados con DNPs mediante adsorción directa.

Finalmente, se aplicaron los biosensores desarrollados para la detección de lactato (LOx/DNPs9/Au, LOx/DNPs9/MPTS/Au y LOx/DNPs4/Au) en muestras reales, concretamente vino y suero humano comercial. Para la determinación de los analitos, se utilizó el método de adición estándar. Los resultados se compararon con los obtenidos por un kit enzimático comercial, obteniéndose valores muy similares por ambos métodos, comprobándose así, su aplicabilidad a la determinación de lactato en muestra real.

Otro de los nanomateriales utilizado en este trabajo es el ZnO. El ZnO es un semiconductor tipo-n con un salto de banda de 3.3 eV, un punto isoeléctrico alto, de 9.5, y presenta fotoluminiscencia (PL) a temperatura ambiente. En este trabajo se ha aprovechado la fotoluminiscencia del ZnO para el desarrollo de un método óptico de análisis de lactato, rápido y que no necesita del uso de marcadores. El ZnO se sintetizó mediante Transporte Químico de Vapores (Chemical Vapor Transport (CVT)), por el grupo del Profesor José Luis Pau, del Departamento de Física Aplicada de la UAM, con el que existe una colaboración. Los nanohilos sintetizados se caracterizaron morfológicamente mediante SEM, observándose nanohilos de un tamaño aproximado de entre 15 y 30 μm . También se observó la presencia de otro tipo de estructuras tipo tetrápodo. Se estudió la estabilidad en el

tiempo de la PL de los nanohilos de ZnO (ZnO NWs) en medio acuoso. En este caso, la señal PL de los ZnO NWs resultó ser poco estable en el tiempo debido a la baja solubilidad del ZnO en medio acuoso. Sin embargo, es necesario trabajar en medio acuoso tamponado para mantener la actividad de la enzima. Se estudió la interacción de los ZnO NWs con la LOx mediante absorción UV visible, observándose un efecto hipocrómico que corrobora la interacción de los ZnO NWs con la LOx. Finalmente, se obtuvieron los mejores resultados formando el bioconjugado ZnO NWs-LOx mediante incubación durante dos horas, en agitación suave. Se obtuvieron los espectros PL del bioconjugado en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de lactato, empleando una longitud de onda de excitación de 330 nm. Como control, se realizó el mismo experimento con una dispersión de ZnO NWs, sometido al mismo proceso que se realiza para la formación del bioconjugado. Comparando los espectros obtenidos para los ZnO NWs y para el ZnO NWs-LOx se observó un efecto de amortiguación en la PL del bioconjugado, debido al peróxido de hidrógeno generado en la reacción enzimática mediada por la LOx. Se estudió la variación de la PL del bioconjugado frente a cantidades crecientes de lactato obteniéndose una respuesta lineal con un límite de detección de 0.54 μM . La reproducibilidad del método es moderada debido a la baja solubilidad del ZnO.

Por otro lado, tanto las DNPs como los nanohilos de ZnO se han empleado en una modalidad novedosa de la electroquímica, la electroquímica bipolar combinada con UV (BPE&UV), con la intención de obtener la modificación asimétrica de las nanoestructuras. La electroquímica bipolar es un fenómeno basado en la polarización de un material conductor en un campo eléctrico. Si esta diferencia de potencial es suficiente, se pueden dar reacciones redox en los extremos del objeto, generando una reactividad diferente en la superficie de objetos conductores

(partículas Janus) de forma inalámbrica. La diferencia de potencial necesaria para generar la polarización del material depende del tamaño de este, por tanto, para tamaños del orden de nanómetros, la diferencia de potencial que se necesita para generar la polarización es muy elevada. Sin embargo, está descrito que la aplicación de la electroquímica bipolar junto con la exposición simultánea a radiación ultravioleta (BPE&UV) permite superar esta limitación de la técnica. Lo que genera la reacción de oxidación-reducción en este caso no es la diferencia de potencial aplicada, sino la radiación. En este sentido, se ha aplicado esta metodología a nanopartículas de diamante de un tamaño entre 3 y 10 nm, dopadas con boro con el fin de mejorar su conductividad (DNPsB), y a los nanohilos de ZnO. El objetivo es conseguir la modificación asimétrica, tanto de las DNPsB como de los nanohilos de ZnO, con un depósito metálico de oro.

En primer lugar, se fabricó una celda electroquímica formada por un compartimento de reacción con la parte de arriba abierta, para la aplicación de la radiación UV, y dos compartimentos para los electrodos. Los electrodos se fabricaron con minas de grafito. Se optimizaron las condiciones de trabajo, obteniendo el mejor resultado tras aplicar la BPE&UV al 50% de potencia de la lámpara y aplicando un potencial de 0.5 KV durante 10 s.

Tras el tratamiento electroquímico, las DNPsB se observaron mediante AFM, empleando como soporte placas de mica con el fin de comprobar la presencia del depósito metálico de oro, observándose un cúmulo de DNPsB cubierto con un depósito rugoso, consistente con un depósito metálico. La microscopía SEM pone de manifiesto la presencia de agregados de nanopartículas que presentan algunas zonas más brillantes que otras y que podrían corresponder a depósitos metálicos. Sin embargo, no se puede afirmar que exista una modificación asimétrica de las DNPsB.

Igualmente se trató la modificación asimétrica de los nanohilos de ZnO. Para ello se emplearon dos estrategias diferentes. Una de ellas consistió en la preparación de una suspensión de ZnO NWs, conteniendo la sal de oro, HAuCl_4 1mM, que se puso en el compartimento de reacción. En este caso no es necesaria la inmovilización de los nanohilos, como en el caso de las nanopartículas ya que, al aplicar el campo eléctrico, se espera que los nanohilos se orienten paralelos a este. La otra estrategia consistió en la modificación de una placa de mica con una dispersión de ZnO NWs, que se introdujo en la base del compartimento de reacción, con el fin de maximizar las opciones de observar nanohilos modificados tras el experimento. Posteriormente se cubrió con la sal de oro. En las condiciones óptimas de trabajo, la imagen de SEM obtenida tras realizar el experimento, confirmó la presencia de un nanohilo modificado con un depósito de oro en sólo uno de sus extremos. Estos resultados establecen la pauta para confirmar la electroquímica bipolar como una herramienta para lograr la modificación asimétrica de nanomateriales con depósitos metálicos.

ABSTRACT

The main objective of this thesis work is the use of different nanomaterials, specifically diamond nanoparticles (DNPs) and zinc oxide nanostructures (ZnO), for the development of 2D and 3D electrochemical biosensors and optical methods of analysis for the determination of biomarkers of interest, such as glucose and lactate. In addition, an attempt was made to modify these nanomaterials in an asymmetric way using a new electrochemical technique, bipolar electrochemistry combined with ultraviolet radiation (BPE&UV), to obtain nanomaterials with different surface reactivity (Janus).

For the development of 2D biosensors based on nanostructured gold electrodes with DNPs, different methodologies have been followed. First, biosensors based on immobilization by direct adsorption of both DNPs and enzymes onto gold electrodes were developed. In this case, DNPs of two different sizes, 9 nm (DNPs9) and 4 nm (DNPs4), were used and glucose oxidase or lactate oxidase, as recognition element.

As a previous step, the functional groups present on the surface of the two size DNPs were investigated by infrared spectroscopy (IR), finding no great differences between them. Next, the electrochemical behaviour of DNPs adsorbed onto a gold electrode was studied. It was found that, although the DNPs have an insulating character, they show electrocatalytic activity due to the unsaturated functional groups present on their surface. Likewise, the response of DNPs modified electrodes toward a redox mediator, hydroxymethyl ferrocene (HMF), was studied. The electrode modified with the larger nanoparticles (DNPs9/Au) showed a quasi reversible redox process corresponding to the oxidation-reduction of the HMF at +0.30 V. However, the electrode modified with the smaller nanoparticles (DNPs4/Au), in addition to the characteristic redox response of HMF at +0.30 V, showed an irreversible process at +0.15 V. In order to study the process that causes

peak, cyclic voltammograms of DNPs4/Au in HMF were obtained at different potential sweeping rates. From the obtained results, it was concluded that this irreversible peak is due to the adsorption of the HMF.

Glucose and lactate biosensors were developed by immobilizing the corresponding enzyme (glucose oxidase or lactate oxidase) onto the DNPs nanostructured gold electrode (DNPs/Au) by direct adsorption. The different stages of the biosensor development were characterized by Raman spectroscopy, AFM, SEM and cyclic voltammetry. Afterwards, the response of the GOX/DNPs/Au and LOx/DNPs/Au developed biosensors to the addition of glucose and lactate, respectively, in the presence of a redox mediator in solution, hydroxymethyl ferrocene (HMF) was obtained. The use of HMF allows to reduce the overpotential and thus, to avoid possible interferences. The developed biosensors have a good reproducibility and stability with detection limits of 61.6 μM and 15.0 μM , for glucose and lactate respectively, and 134.6 μM and 5.3 μM for the 4 nm nanoparticles biosensors. In all cases, the achieved results are comparable to those found in the literature for lactate and glucose biosensors developed in a similar way. In addition, the LOx/DNPs4/Au biosensor allows to work at +0.15 V, a quite low potential, with the advantage of avoiding possible interferences.

On another front, a 3D biosensor based on the integration of diamond nanoparticles, in this case DNPs9, and the biological recognition element, LOx, in a three-dimensional sol-gel network using 3-mercaptopropyltrimethoxysilane (MPTS) as a precursor, was developed (LOx/DNPs9/MPTS/Au). The use of the sol-gel process stands out as a form of preparation of porous organic-inorganic hybrid materials, which allow to create a suitable environment to retain the structure and activity of the enzyme encapsulated in it. The morphological study of all stages of the biosensor development was carried out by AFM. Subsequently, the study of its electrochemical response to lactate in the presence of HMF was also performed,

obtaining a detection limit of 16 μM . It should be noted that, as expected, in this case, a great improvement of 50% in the stability of the biosensor was obtained comparing to the previously developed biosensors, prepared with DNPs by direct adsorption.

Finally, the developed biosensors for the detection of lactate (LOx/DNPs9/Au, LOx/DNPs9/MPTS/Au and LOx/DNPs4/Au) were applied to the determination of this analyte in wine and commercial human serum real samples, using the standard addition method. The results were compared with those obtained by an enzymatic commercial kit, obtaining similar values by both methods, verifying its applicability to the determination of lactate in real samples.

Another nanomaterial used in this work has been ZnO NWs. The ZnO is an n-type semiconductor with a band gap of 3.3 eV and high isoelectric point, 9.5, that exhibits photoluminescence (PL) at room temperature. In this work, ZnO photoluminescence has been used for the development of a fast and label-free optical method for lactate analysis. ZnO was synthesized by Chemical Vapour Transport (CVT) by Professor José Luis Pau's group, from the Applied Physics Department of the UAM, in a collaborative project. The synthesized ZnO nanowires (ZnO NWs) were morphologically characterized by SEM, and nanowires with sizes between 15 and 30 μm were observed. The presence of another type of nanostructures, like tetrapod, was also observed. The stability of ZnO NWs PL over time in aqueous medium was studied. In this case, the ZnO NWs PL signal turned out to be unstable over time due to the low solubility of ZnO in aqueous medium. However, it is necessary to work in a buffered aqueous medium to maintain the activity of the enzyme. The interaction between ZnO NWs and LOx was studied by UV-visible absorption, observing a hypochromic effect that corroborates the interaction of ZnO NWs with LOx. Finally, a ZnO NWs-LOx bioconjugate was formed

by incubation during two hours, in gentle agitation. The bioconjugate PL spectra were obtained before and after the addition of increasing concentrations of lactate, using an excitation wavelength of 330 nm. The same experiment was carried out, as a control, with a dispersion of ZnO NWs, subjected to the same process carried out for the bioconjugate formation. Comparing both ZnO NWs and ZnO NWs-LOx spectra obtained, a quenching effect was observed in the bioconjugate PL upon addition of lactate, due to the hydrogen peroxide generated in the LOx mediated enzymatic reaction. The variation of the bioconjugate PL was studied towards the addition of increasing amounts of lactate, obtaining a linear response with a limit of detection of 0.54 μM . The reproducibility of the method is moderate due to the low solubility of ZnO.

Finally, both DNPs and ZnO nanowires have been used in a novel form of electrochemistry, bipolar electrochemistry combined with UV radiation (BPE & UV), with the aim of obtaining asymmetric modification of the nanostructures with gold. Bipolar electrochemistry is a phenomenon based on the polarization of a conductive material in an electric field. If the potential difference is high enough, redox reactions can occur at the ends of the object, generating a different reactivity on the surface of conductive objects (Janus particles) in a wireless way. The potential difference needed to generate the polarization of the material depends on its size, therefore, for small sizes, on the order of nanometers, the potential difference needed is very high. However, the application of bipolar electrochemistry together with simultaneous exposure to ultraviolet radiation (BPE & UV) allows to overcome this technique limitation. The oxidation-reduction reaction, in this case, is not generated by the applied potential difference, but by the UV radiation. In this sense, this methodology has been applied to diamond nanoparticles, with a size between 3 and 10 nm, doped with boron in order to improve their conductivity

(DNPBs), and ZnO nanowires. The objective is to achieve the asymmetric modification of both DNPBs and ZnO nanowires with a metallic gold deposit. For this purpose, an electrochemical cell was constructed. It was formed by a reaction compartment with an open upper side, for the application of UV radiation, and two compartments for the electrodes. The electrodes were made with graphite leads. The working conditions were optimized and the best result was obtained after applying the BPE & UV at 50% lamp power and a potential of 0.5 KV during 10 s. After the electrochemical treatment, the DNPBs were observed by AFM, using mica plates as support, in order to verify the presence of the metallic gold deposit. A cluster of DNPBs covered with a rough deposit was observed, consistent with a metallic deposit. The SEM microscopy reveals the presence of nanoparticles aggregates that have some areas brighter than others, which could correspond to metal deposits. However, an asymmetric modification of the DNPBs cannot be concluded.

The asymmetric modification of ZnO nanowires was also tried. For this, two different strategies were used. One of them consisted in the preparation of a ZnO NWs dispersion containing the gold salt, 1mM HAuCl_4 , which was placed in the reaction compartment. In this case, it is not necessary to immobilize the nanowires, as it is expected a parallel orientation of the nanowires to the applied electric field. The other strategy consisted on the modification of a mica plate with a ZnO NWs dispersion, which was immobilized at the bottom of the reaction compartment, in order to maximize the possibilities of finding modified nanowires after the experiment. Later, it was covered with gold salt. In optimal working conditions, the SEM image obtained after the experiment confirmed the presence of a nanowire with a gold deposit in only one of its ends.

These results lay the foundations for confirming bipolar electrochemistry as a tool to achieve asymmetric modification of nanomaterials with metallic deposits.



INTRODUCCIÓN

1. BIOSENSORES

Uno de los mayores retos de los últimos años en sectores como el diagnóstico clínico, la biología, la industria alimentaria, etc., es la necesidad de conseguir dispositivos sensibles, fáciles de manejar, portables y económicos para la determinación de analitos de interés. En este sentido, los sensores químicos son una herramienta analítica que nos permite obtener la información necesaria, tanto cualitativa como cuantitativa, de una forma rápida, fiable y barata, permitiendo, además, obtener información de forma continua y en tiempo real.

1.1. Definición y clasificación

Los sensores son dispositivos capaces de responder de manera selectiva a un analito concreto en una matriz compleja. Se componen de dos partes fundamentales: el elemento de reconocimiento, que interacciona de forma selectiva con el compuesto de interés o analito y el transductor, que convierte la interacción en una señal cuantificable, proporcional a la concentración de analito en la muestra, y que es recogida y procesada por el sistema de detección [Reviejo, 2000; Grieshaber, 2008] (figura I1).

Los sensores que emplean reacciones biológicas para el reconocimiento de las especies de interés son los denominados biosensores. La IUPAC define biosensor como: “A device that uses specific biochemical reactions mediated by isolated enzymes, immunosystems, tissues, organelles or whole cells to detect chemical compounds usually by electrical, thermal or optical signals”. Por tanto, los biosensores son sistemas que permiten la determinación selectiva de un analito gracias a la especificidad del componente biológico.

El trabajo desarrollado en esta tesis se basa en este tipo de sensores, por lo que se tratarán con más detalle en esta introducción.

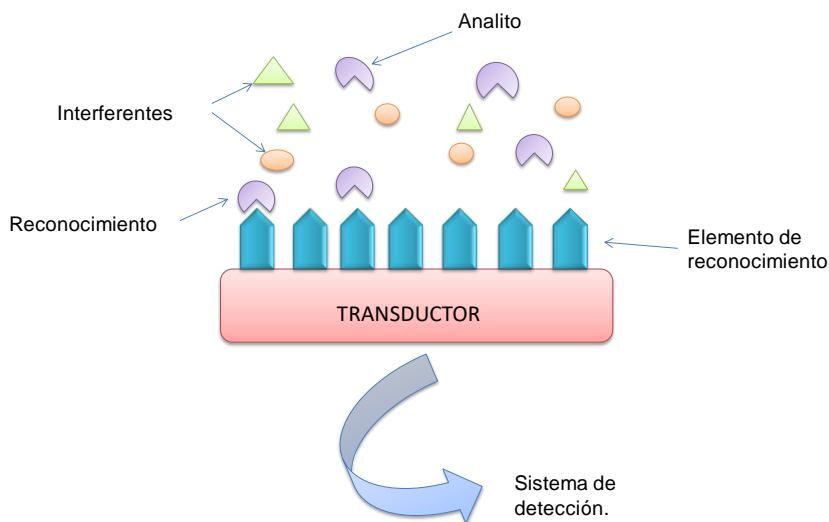


Fig. I1. Esquema de un sensor químico.

La elevada afinidad que tienen los elementos de reconocimiento biológico para enlazarse de forma específica con la molécula de interés hace que los biosensores presenten mayor selectividad que los sensores [Chaubey, 2002]. Según el elemento de reconocimiento empleado hablamos de biosensor enzimático (emplea enzimas), de ADN (emplea cadenas de ADN) o inmunosensor (emplea anticuerpos).

- Los anticuerpos son biomoléculas complejas, compuestas por cientos de aminoácidos ordenados en secuencias. Cada anticuerpo reconoce de forma específica a un antígeno, lo que es crucial para su empleo en inmunosensores donde sólo el analito, el antígeno, se ancla al sitio de reconocimiento del anticuerpo [Vo-Dinh, 2000]. La interacción puede ser de dos tipos, directa o indirecta. La vía directa está basada en la interacción del analito y el ligando directamente. En inmunosensores, el experimento más sencillo consiste en una incubación “in situ”

seguido de la medida directa de fluorescencia proveniente del analito [Vo-Dinh, 1987]. Para analitos no fluorescentes, el proceso de incubación va seguido de la modificación con un segundo anticuerpo marcado con un fluoróforo (vía indirecta). Se utiliza una especie marcada que se detecta tras el evento de reconocimiento por fluorescencia o luminiscencia. En este caso el analito no marcado actúa como competidor del marcado por un número limitado de sitios receptores. El principio del ensayo se basa en el cambio de la señal que se produce cuando el analito marcado forma un conjugado con el anticuerpo [Monošík, 2012].

- Los biosensores basados en ADN, ARN, o péptidos tienen su fundamento en la gran sensibilidad y selectividad que presentan las pares de bases complementarias (adenina-timina, citosina-guanina) [Monošík, 2012]. Los biosensores electroquímicos de ADN, basados en la conversión del evento de reconocimiento de las pares de bases en una señal eléctrica medible, están teniendo gran auge para el desarrollo de métodos de diagnóstico rápidos y baratos de enfermedades genéticas, detección de patógenos de interés clínico, etc. [Wang J., 1999; Lucarelli, 2004].

- Las enzimas son ampliamente usadas como biomaterial para el desarrollo de biosensores. Son moléculas de naturaleza proteica que actúan como catalizadores de reacciones químicas que son termodinámicamente posibles pero que transcurren a una velocidad baja. Actúan sobre los denominados sustratos (S), convirtiéndolos en moléculas diferentes, los productos (P). Para llevar a cabo este proceso, la enzima se une al sustrato por el centro activo, originando un complejo reversible enzima-sustrato intermedio (ES), que luego se descompone para liberar los productos de la reacción.



Existen seis tipos de enzimas dependiendo del tipo de reacción que catalizan: las oxidoreductasas, las transferasas, las hidrolasas, las liasas, las isomerasas y las ligasas. En concreto, las oxidoreductasas catalizan reacciones de oxidación o reducción, que implican la transferencia de electrones y son ampliamente usadas para el desarrollo de biosensores [Monošík, 2012].

Aunque hay que tener en cuenta la dependencia de la actividad enzimática del pH, de la fuerza iónica y de la temperatura, los biosensores enzimáticos son altamente selectivos, auto-regenerables, de fácil manejo y con un coste razonable.

Por otro lado, los sensores y biosensores también se pueden clasificar según la naturaleza del transductor usado, pudiendo ser de tipo electroquímico, óptico, térmico o másico. Los empleados con más frecuencia son los electroquímicos y los ópticos.

1.1.1. Transductores electroquímicos

Cuando el transductor es electroquímico hablamos de electrodos. Su uso está muy extendido gracias a las ventajas que ofrece frente a otros tipos de sensores o biosensores [Reviejo, 2000]:

- se pueden emplear volúmenes de muestra pequeños debido a la naturaleza interfacial de las medidas, lo que los hace especialmente adecuados para las medidas “in vivo”
- los límites de detección son suficientes y adecuados para muchos analitos de interés
- amplio intervalo de linealidad y tiempos de respuesta cortos
- la simplicidad y bajo coste de la instrumentación, lo que les hace fácilmente miniaturizables y permite desarrollar dispositivos portátiles

Este tipo de transductores presenta otra gran ventaja, y es la gran variedad de materiales con los que se pueden fabricar dependiendo de la aplicación. Como condición general los materiales empleados como electrodos deben ser conductores. Entre los más usados están los metales, como oro (Au) y platino (Pt), los óxidos metálicos, como óxidos de indio y titanio (ITO), materiales de carbono, como grafito, y polímeros conductores, como polipirrol y poliestireno [Scholz, 2010].

Los sensores electroquímicos se pueden clasificar en conductimétricos, impedimétricos, potenciométricos y amperométricos [Mello, 2002; P. D. Patel, 2002; Velasco-García, 2003; Leonard, 2003], siendo estos dos últimos los más empleados. Los transductores electroquímicos potenciométricos miden la diferencia de potencial debida a una reacción electroquímica entre un electrodo de trabajo y un electrodo de referencia, mientras que los transductores electroquímicos amperométricos miden la corriente resultante de los procesos de oxidación-reducción al aplicar un potencial.

Los biosensores enzimáticos electroquímicos permiten, por tanto, la detección de infinidad de sustancias con una alta selectividad, debido a la enzima, y una gran sensibilidad, inherente a las técnicas electroquímicas.

1.1.2. Transductores ópticos

Algunas de las propiedades de la luz pueden ser aprovechadas para el desarrollo de sensores, en este caso es la luz la que proporciona la información. Los efectos ópticos que se suelen utilizar son: la fluorescencia, las configuraciones de campo evanescente y la absorción. Uno de los efectos ópticos más empleados es la fluorescencia, debido a su selectividad y sensibilidad. Los sensores basados en fluorescencia detectan cambios en la emisión de luz por parte de los átomos

cuando, tras un proceso previo de excitación, éstos vuelven al estado fundamental. Cada analito genera unos espectros característicos de excitación-emisión, con lo que es posible determinarlos [Velasco-García, 2009].

La configuración de campo evanescente se refiere a sensores que emplean guías de onda, es decir, la luz se transmite en condiciones de reflexión total interna. El campo electromagnético no queda del todo confinado por lo que parte sale al exterior presentando un decaimiento exponencial. El campo evanescente es el que detecta la sustancia de interés, ya que cualquier cambio que se produzca en él influye en las características de la luz propagada por el interior de la guía.

En el caso de que la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito lleve asociado un fenómeno de adsorción, la cantidad de luz que llegue al detector se verá afectada [Monošík, 2012].

1.2. Estrategias de inmovilización del agente de reconocimiento biológico

Una de las etapas más importantes en el desarrollo de un biosensor es la inmovilización del elemento de reconocimiento sobre la superficie del transductor [Reviejo, 2000].

En concreto para los biosensores enzimáticos el método de inmovilización de la enzima sobre el transductor constituye una de las etapas más importantes en su desarrollo ya que puede restringir, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de las enzimas por su unión al transductor, así como disminuir su actividad enzimática al producirse alteraciones en su conformación [Arroyo, 1998]. Según la naturaleza del elemento de reconocimiento biológico, el tipo de transductor, las propiedades físico-químicas del analito y las condiciones de medida se seleccionará un tipo u otro de inmovilización [D'Souza, 2001].

En general, para cualquier tipo de biosensor, la inmovilización puede llevarse a cabo por métodos físicos o químicos [Reviejo, 2000]. Dentro de los métodos físicos los más comunes son la adsorción física [Nanduri, 2007] y el atrapamiento, mediante inclusión del elemento de reconocimiento en una matriz polimérica o gel [Gupta R., 2007] o por encapsulación en una membrana [Scouten, 1995; Pancrazio, 1998; Sharma, 2003]. Respecto a los métodos químicos, los más comúnmente empleados son el enlace covalente [Schuhmann, 1990], o el entrecruzamiento intermolecular [Nenkova, 2010].

- Adsorción física: los métodos de adsorción física emplean una combinación de fuerzas de Van der Waals y fuerzas hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno y fuerzas iónicas para unir el elemento de reconocimiento a la superficie del transductor. La gran ventaja de este método es su versatilidad ya que puede aplicarse a distintos tipos de enzima que catalizan diferentes reacciones. Sin embargo, este método está limitado por la afinidad entre la enzima y el transductor [Jesionowski, 2014]. También hay que tener en cuenta que la unión producida es débil, es una adsorción no específica, por lo que se requiere un control estricto del proceso y se pueden producir pérdidas del elemento de reconocimiento.

- Atrapamiento en matriz polimérica o gel: en este caso el elemento de reconocimiento queda retenido en una matriz polimérica. Para este método se suele emplear poliacrilamida, alginato, alcohol de polivinilo, policarbonato, acetato de celulosa, silica gel, etc. Como desventaja este método puede sufrir pérdida del elemento de reconocimiento durante su uso, perdiendo por tanto actividad [Collings, 1997].

- Encapsulación: en este método se forma una matriz porosa para encapsular el elemento de reconocimiento biológico, y ayudar a anclarlo a la superficie del

transductor. En concreto el uso del proceso sol-gel destaca como una forma de preparación de materiales porosos híbridos orgánico-inorgánicos, que permiten crear un entorno adecuado para retener la estructura y actividad de la enzima encapsulada en su interior. Este proceso se realiza a baja temperatura y consiste en la hidrólisis de un alcóxido monomérico usado como precursor, normalmente un alcóxido de silicio, en presencia de un catalizador ácido, que acelera el inicio de la reacción, y un alcohol alifático para lograr la homogeneidad entre la fase acuosa y la orgánica, seguida de una policondensación. Como puede verse en la figura 12, se forman enlaces Si-O-Si interconectados, que se comportan como partículas coloidales (sol) y que se unen formando una red tridimensional tipo óxido [Haruvy, 1991; Walcarius, 2001]. Entre los alcóxidos de Si más usados, están el tetraetoxisilano (TEOS), el metiltrimetoxisilano (MTMOS) o el 3-mercaptopropiltrimetoxisilano (MPTS). Pueden usarse distintos tipos de electrodos como transductores para inmovilizar el material híbrido obtenido. En ese sentido, el uso de MPTS como precursor permite su inmovilización sobre electrodos de oro, aprovechando la gran afinidad de los grupos tioles presentes en dicho precursor por este material.

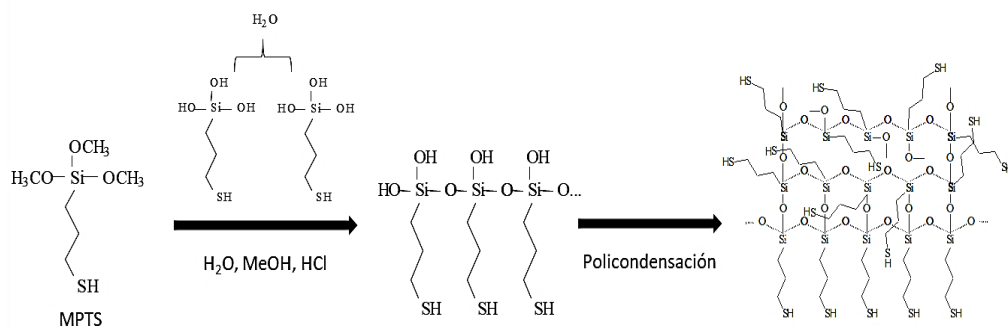


Fig. 12. Formación de la red sol-gel a partir del alcóxido monomérico precursor 3-mercaptopropiltrimetoxisilano (MPTS). Reacciones de hidrólisis y policondensación.

Aunque hoy por hoy es difícil conseguir sol-geles con tamaños de poro totalmente reproducibles y presentan algunas limitaciones en la difusión dentro de los poros, las biomoléculas inmovilizadas por este procedimiento presentan una gran estabilidad.

- Enlace covalente: la superficie del transductor se modifica con el fin de generar grupos reactivos a los cuales puede unirse el elemento de reconocimiento biológico. En el caso de biosensores enzimáticos este enlace se produce mediante los grupos funcionales de la enzima que no son esenciales para su actividad catalítica, como grupos amino, carboxílicos, tiol, hidroxilo, etc., presentes en las cadenas de aminoácidos de las proteínas. Los reactivos comúnmente usados en este tipo de inmovilización son glutaraldeído, carbodiimida, éster succinimida, etc. Este método de inmovilización mejora la uniformidad en la distribución del elemento biológico sobre la superficie del transductor, así como la reproducibilidad [Collings, 1997].

- Entrecruzamiento intermolecular: para este método se suelen emplear reactivos bi o multifuncionales como glutaraldehído, el 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno, el hexametilen diisocianato, etc. De ellos el más usado en el desarrollo de biosensores es el glutaraldehído que se une a las lisinas de las enzimas [Collings, 1997; Monošík, 2012].

1.3. Integración de nanomateriales en el desarrollo de biosensores

En los últimos años, el uso de nanomateriales ha ido en aumento con el fin de mejorar las propiedades analíticas de los biosensores, como la sensibilidad y los límites de detección [Pingarrón, 2008; Agüí, 2008; Wang J., 2015] debido a las propiedades físico-químicas que presentan, diferentes a las de los materiales

macroscópicos [Vaseashta, 2005]. Estas propiedades físico-químicas permiten, entre otras cosas, la inmovilización de una mayor cantidad del elemento de reconocimiento biológico en un volumen reducido [Holzinger, 2014].

1.3.1. Definición y clasificación de nanomateriales

Un nanomaterial es aquel que presenta, al menos en una de sus dimensiones, un tamaño en el rango de la nanoescala, entre 1 y 100 nanómetros (nm). Teniendo en cuenta el número de dimensiones del nanomaterial que superan el rango de la nanoescala, estos se pueden clasificar en cuatro categorías [Pokropivny, 2007; Pokropivny, 2008]:

- 0D: a esta categoría pertenecen los nanomateriales que tienen todas sus dimensiones en la escala nanométrica. Entre estos nanomateriales se encuentran, entre otros, las nanopartículas, los nanopuntos, los fullerenos y el nanodiamante.
- 1D: en este caso, el nanomaterial tiene una de sus dimensiones fuera de la nanoescala, mayor de 100 nm. Dentro de esta categoría encontramos los nanotubos, las nanofibras, etc.
- 2D: dos de sus dimensiones superan los 100 nm, por tanto, sólo una de ella se mantiene en el rango de la nanoescala. Este es el caso del grafeno, las monocapas, etc.
- 3D: en esta categoría se engloban las nanoestructuras formadas a partir de nanomateriales de las categorías anteriores (policristales, compósitos, etc.).

1.3.2. Propiedades de los nanomateriales

Los nanomateriales presentan propiedades físico diferentes a las de los materiales macroscópicos [Murray, 2008; Zhang X., 2009; Abu-Salah, 2010]. Estas diferentes

propiedades que presentan los materiales a escala nanométrica se deben, por un lado, a su elevada área superficial, lo que aumenta su reactividad debido a la presencia de un mayor número de átomos accesibles en su superficie y, por otro, a los efectos cuánticos, los cuales afectan a las propiedades ópticas, magnéticas y eléctricas de los nanomateriales.

Por otro lado, las propiedades de los nanomateriales no solo dependen de su composición, tamaño y forma, sino también, en gran medida, de los grupos funcionales presentes en su superficie. Estos grupos funcionales definen su reactividad, estabilidad física y química, su estructura y, por tanto, sus posibles aplicaciones. Derivadas de estas propiedades, los nanomateriales presentan ciertas características [Ansari, 2010].

- Tamaño: la diferencia en el tamaño de las nanopartículas tiene un efecto importante en sus propiedades estructurales, electrónicas, espectroscópicas, electromagnéticas y químicas, por lo que, sólo modificando su tamaño a escala nanométrica se pueden obtener distintas propiedades.

- Química superficial: sobre los nanomateriales se pueden adsorber o unir covalentemente biomoléculas debido a su gran área superficial específica y a una elevada energía libre superficial, producida al reducirse el número de coordinación de los átomos presentes en la superficie [Wanekaya, 2006; Luo, 2006].

- Propiedades catalíticas: los nanomateriales presentan una elevada reactividad química, consecuencia de su elevada superficie específica y del gran número de átomos en la superficie que originan una elevada energía superficial. Debido a esta gran reactividad química de su superficie, estos materiales presentan importantes propiedades catalíticas. Además, la introducción de nanomateriales con propiedades catalíticas en sensores y biosensores electroquímicos puede disminuir

los sobrepotenciales de muchas reacciones electroquímicas de importancia analítica. En concreto las nanopartículas de metales nobles, debido a su estabilidad, han sido ampliamente usadas como catalizadores en el desarrollo de biosensores [Katz, 2004; Pingarrón, 2008; Valentini, 2008].

- Conductividad eléctrica: depende en gran medida de la estructura nanocristalina de material [Wang J., 2005], pero en general, los materiales a escala nanométrica presentan mejores propiedades de transporte electrónico que el correspondiente material macroscópico.

- Biocompatibilidad: los nanomateriales presentan una gran biocompatibilidad, lo que ha supuesto una revolución sobre todo en el sector de la medicina, en gran variedad de aplicaciones diagnósticas y terapéuticas como imagen diagnóstica [Guerrero, 2012; Bakthavathsalam, 2012; Deng, 2012], terapia foto-termal [Kuo, 2012], y liberación de fármacos o “drug delivery” [Fischer, 2007], entre otros. Sin embargo, hay que tener en cuenta que tanto las propiedades físico-químicas del nanomaterial (tamaño, forma, características superficiales) como el medio con el que entra en contacto, influyen en el grado de biocompatibilidad concreto de cada nanomaterial [Dobrovolskaia, 2007; Dobrovolskaia, 2008; Aggarwal, 2009] . Por tanto, para asegurar un uso seguro y efectivo, sobre todo en aplicaciones médicas, se deben estudiar y caracterizar las interacciones entre el nanomaterial y el sistema biológico de interés [Naahidi, 2013].

1.3.3. Nanomateriales de carbono. Nanopartículas de diamante (DNPs)

Las buenas propiedades electrónicas, ópticas, térmicas, mecánicas y químicas de los nanomateriales de carbono han hecho de ellos uno de los nanomateriales más empleados en el desarrollo de biosensores [Vamvakaki, 2007; Valentini, 2013].

Entre los nanomateriales de carbono más usados se encuentran el grafeno, los nanotubos de carbono y, más recientemente, las nanopartículas de diamante [Holzinger, 2014].

El grafeno fue descubierto por Geim y Novoselov en 2004 [Novoselov, 2004]. Está formado por átomos de carbono unidos mediante enlace sp^2 , formando una lámina con un espesor monoatómico y estructura hexagonal. Además, constituye la unidad básica estructural de otros materiales de carbono, como el grafito, los nanotubos de carbono o los fullerenos [Allen, 2010] (figura I3). Presenta unas excelentes propiedades debidas a los fuertes enlaces entre los carbonos sp^2 y a la conjugación del sistema π de su estructura. Entre sus propiedades, la alta conductividad eléctrica [Stankovich, 2007], así como sus excelentes propiedades electroquímicas, una amplia ventana de potencial, baja resistencia a la transferencia de carga, excelente actividad electrocatalítica [Gao, 2015] o la capacidad de evitar el envenenamiento de los electrodos [Lin, 2009], lo convierten en un material muy interesante para una gran variedad de aplicaciones. Entre estas aplicaciones destaca su uso en el desarrollo de sensores y biosensores electroquímicos [Pumera, 2010], tanto en biosensores enzimáticos [Shan, 2009] como en otro tipo de biosensores como los inmunosensores [Jung, 2010], o los genosensores [Bo, 2011].

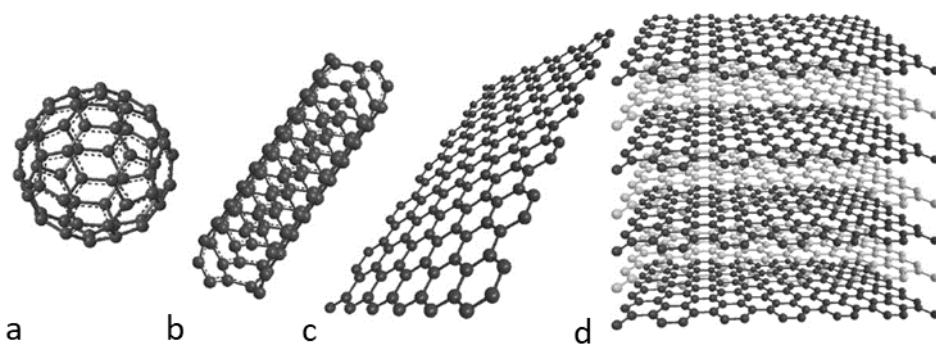


Fig. I3. Estructura de a) fullereno, b) nanotubo, c) grafeno y d) grafito [Pumera, 2010].

Los nanotubos de carbono (CNTs), descubiertos por lijima en 1991 [Iijima, 1991], han generado un gran interés debido a sus singulares propiedades dependientes de su estructura electrónica y mecánica [Chopra, 2007; Yogeswaran, 2008]. Su estructura es cilíndrica y están formados por una lámina de grafeno, llamados nanotubos de pared simple (SWCNTs), o varias láminas, nanotubos de pared múltiple (MWCNTs). Presentan un diámetro del orden de unos pocos nanómetros, dependiendo del número de láminas que lo formen, pero su longitud es del orden de los micrómetros [Eatemadi, 2014]. Dentro de sus propiedades, destaca su capacidad para lograr transferencia de carga directa en el desarrollo de biosensores electroquímicos [Zhao Y.D., 2002; Das, 2013].

Nanopartículas de diamante (DNPs)

En este trabajo se han empleado nanopartículas de diamante para el desarrollo de biosensores electroquímicos por lo que se desarrollarán con más detalle esta introducción.

El diamante a escala nanométrica se obtuvo por primera vez, por detonación, en la antigua URSS en los años 60 [Danilenko, 2004], pero no fue conocido en el resto del mundo hasta los años 80 [Greiner, 1988]. Fue a partir de los años 90 cuando, gracias a los avances en nanotecnología, el interés en este tipo de nanomaterial fue creciendo [Mochalin, 2012].

Las nanopartículas de diamante poseen las propiedades del diamante, así como nuevas propiedades debidas a su nanoestructura. Las nanopartículas de diamante suelen tener un tamaño de entre 2 y 100 nm. Existen distintos métodos de síntesis que dan lugar a nanopartículas con diferentes características, pero, en general, las nanopartículas de diamante poseen un núcleo de diamante, formado por carbonos sp^3 , rodeado por una capa de carbonos sp^2 amorfos [Bhushan, 2014].

1.3.3.1. Síntesis de las DNP

Existen distintos métodos de síntesis de las nanopartículas de diamante. El más simple es la técnica de la molienda. En este método se parte de partículas de diamante de tamaño micrométrico, sintético o natural, que se muelen, y tras eliminar las partículas de mayor tamaño que hayan podido quedar, se obtiene un tamaño de nanopartículas por debajo de los 100 nm [Niwase, 1995]. Otra de las técnicas que se emplean para la obtención de este tipo de nanomaterial es la técnica de deposición química de vapor (chemical vapor deposition CVD). La deposición química de vapor es la descomposición catalítica de compuestos de carbono arrastrados por un flujo continuo de gas, que atraviesa un horno a presión atmosférica. El flujo, vertical u horizontal, arrastra tanto al compuesto carbonado como al gas inerte sobre una superficie catalizadora a una temperatura de 500 – 1200 °C. Un enfriamiento posterior, hasta temperatura ambiente, provoca la deposición de los átomos de carbono, obtenidos por descomposición térmica, sobre las partículas metálicas, que actúan como sitios de nucleación [Frenklach, 1989]. Las nanopartículas de diamante obtenidas por este método suelen alcanzar los 500 nm.

Otra alternativa para la obtención a gran escala de nanopartículas de diamante es el llamado “shockwave” u ondas de choque. En este método, el material grafitico se mezcla con cobre para mejorar el transporte de calor. La onda generada comprime el tubo inerte que contiene el material carbonaceo, aumentando la presión y la temperatura para transformar el grafito en diamante. Las nanopartículas obtenidas son de escala nanométrica y están cubiertos de carbono grafitico [Novikov, 1999].

Otra técnica es la síntesis por detonación, figura I4. La primera síntesis de nanodiamante que se realizó por este método fue descrita en 1963 por Titov y colaboradores [Danilenko, 2004]. En este caso el producto final obtenido estaba

formado por agregados muy compactos, difíciles de aislar y dispersar. No fue hasta 2002 cuando Osawa y sus colaboradores consiguieron una dispersión de nanopartículas de diamante en medio acuoso [Krüger, 2005]. El método de detonación consiste en depositar una carga explosiva dentro de un compartimento de reacción y detonarlo. Durante el proceso no se necesita un aporte de material de carbono para la formación del hollín de diamante. El material obtenido por este método contiene hasta un 80% de nanopartículas de diamante, así como impurezas metálicas y restos del compartimento de reacción, además de gran número de carbonos de tipo no-diamante [Krueger, 2008a].

Tras el primer paso de purificación, el hollín en bruto se recoge y purifica mediante un tratamiento ácido que, no sólo reduce el contenido de metal en el material, sino que también oxida el carbono no-diamante presente en el hollín.

Debido al hecho de que la reactividad de los carbonos sp^2 , especialmente el material grafitico desordenado, frente a la oxidación es mucho mayor que para el carbono tipo diamante, es posible eliminar selectivamente el carbono sp^2 de manera que el contenido en carbono diamante puede enriquecerse. El contenido final en carbono diamante es de aproximadamente el 95%, con aproximadamente un 2% de nitrógeno, así como hidrógeno y oxígeno y con trazas de hierro y otros metales [Krueger, 2008a].

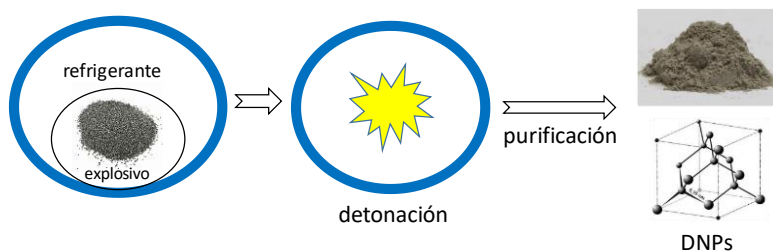


Fig. I4. Síntesis de DNP mediante el método de detonación.

Para los nanomateriales, la distribución de tamaño es un factor muy importante ya que las propiedades física y químicas requieren distribución de tamaños lo más homogénea posible [Gupta A.K., 2005]. El tamaño de las nanopartículas de diamante obtenidas depende mucho del método de producción empleado. De entre los cuatro métodos para producir DNPs, la técnica de la molienda genera DNPs de mayor tamaño y mayor distribución de tamaños, el método CVD también genera nanopartículas de mayor tamaño. Respecto al método “shockwave”, el tamaño y distribución de las nanopartículas obtenidas depende de la granulometría del material grafitico original y los cristales de diamante suelen formarse juntos en lugar de formar partículas aisladas [Krueger, 2008a; Krueger, 2008b].

En la síntesis por detonación, tras el tratamiento ácido de oxidación para eliminar los carbonos sp^2 que se lleva a cabo, sigue existiendo carbono grafitico en la muestra, lo que provoca la aglomeración entre las partículas [Krueger, 2008b]. Se han desarrollado varios métodos, entre ellos el proceso de agitación con micro cuentas de cerámica, para conseguir la desaglomeración completa de las partículas. Por eso el diamante obtenido por detonación, también conocido como diamante ultradisperso (UDD) normalmente alcanza los 5 nm, así como una distribución homogénea de tamaño [Krüger, 2005].

Por tanto, comparando con los métodos de molienda, CVD y “shockwave”, el nanodiamante obtenido mediante detonación presenta un menor tamaño y una distribución de tamaño más uniforme, lo que le confiere una mayor área superficial específica.

Por otro lado, dependiendo de los diferentes métodos de producción, la superficie de las nanopartículas de diamante presenta distintas características. El proceso de CVD genera nanopartículas con terminaciones hidrogenadas, que no pueden conseguirse mediante detonación o “shockwave” [Frenklach, 1989]. Las nanopartículas de diamante generadas por “shockwave” tiene una superficie

gráfitica. En el caso de las obtenidas mediante detonación presentan en su superficie grupos funcionales oxigenados [Aleksenskii, 1999; Krüger, 2005], como resultado de los procesos de purificación. Normalmente, los grupos funcionales presentes en la superficie de las DNP's obtenidas mediante detonación son grupos carboxilo, hidroxilo, lactonas, cetonas y ésteres haciendo posible funcionalizar la superficie mediante enlace covalente o no covalente. Tras los grupos funcionales de la superficie, hay una fina capa de carbono gráfitico sobre la superficie del nanodiamante. Para el nanodiamante obtenido por detonación esta capa de carbono gráfitico constituye el 5% de la masa total incluso tras la oxidación con tratamiento ácido, para el caso del método de "shockwave" el porcentaje es aún mayor [Krueger, 2008a].

Por tanto, la superficie de las DNP's está formada por los grupos funcionales oxigenados, sobre todo carboxilos e hidroxilos, y una capa de grafito. La presencia de grupos oxigenados facilita la dispersión de las DNP's mientras que la presencia de la capa gráfitica puede facilitar los procesos de aglomeración de las partículas [Krueger, 2008b]. El contenido de grupos oxigenados en la superficie de las DNP's varía dependiendo de los métodos de producción. A veces, la superficie de las DNP's se somete a tratamientos posteriores según las diferentes aplicaciones. Normalmente la funcionalización del nanodiamante es el tratamiento más común. Se basa en facilitar su dispersión aumentando el número de grupos funcionales que presentan oxígeno mientras se reduce el contenido de la capa de grafito, o introduciendo nuevos grupos funcionales (por medios físicos o químicos) en su superficie para facilitar su dispersión y dotarlos de funcionalidades específicas.

En general, los métodos empleados para la funcionalización de las DNP's incluyen oxidación o reducción. La oxidación es una de las mejores formas de modificación de las propiedades superficiales de las DNP's. Dentro de los diferentes métodos de oxidación, el tratamiento ácido es uno de los más empleados y de los más efectivos,

generando grupos que contienen oxígeno (sobre todo carboxilos e hidroxilos) sobre la superficie de las nanopartículas [Loktev, 1991; Ushizawa, 2002; Kruger, 2006; Chao, 2007]. El proceso de oxidación por tratamiento ácido puede oxidar selectivamente los carbonos gráficos sp^2 existentes y eliminar impurezas metálicas de la superficie. Tras el tratamiento ácido oxidativo la superficie de las DNP se funcionaliza con grupos carboxilo los cuales pueden ser posteriormente modificados mediante diferentes métodos físicos y químicos.

Otro método para la modificación de las propiedades de la superficie de las DNP es el tratamiento térmico oxidativo el cual oxida la superficie de las nanopartículas aumentando el número de grupos oxigenados y mejorando la facilidad de dispersión de las DNP [John, 2002; Shenderova, 2006; Osswald, 2006; Yeap, 2008; Pichot, 2008] ya que la oxidación térmica en presencia de oxígeno puede eliminar los carbonos sp^2 [Pichot, 2008].

La oxidación térmica en aire seguido de ultrasonidos puede dar lugar a una buena dispersión de las DNP en agua, pero durante el tratamiento térmico se pueden formar enlaces entre las nanopartículas de diamante que pueden generar fenómenos de agregación. A pesar de esto, en general, el efecto positivo del aumento de la dispersión supera el efecto negativo de la formación de enlaces entre las DNP [Shenderova, 2006].

Por otro lado, los tratamientos que emplean la reducción, permiten obtener nanopartículas de diamante hidrogenadas, mediante la reacción de las DNP con hidrógeno [Spitsyn, 2006], o con grupos hidroxilo mediante reacción con borano [Kruger, 2006].

1.3.3.2. Biocompatibilidad de las DNP

Cuando se habla de aplicaciones biológicas, la biocompatibilidad de los materiales es un factor muy importante a tener en cuenta. Las DNP están fabricadas a partir

de carbono por lo que presentan buena biocompatibilidad [Nguyen, 2007; Puzyr, 2007; Liu K.K., 2008; Krueger, 2008a; Krueger, 2008b; Krueger, 2008c]. Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, las nanopartículas de diamante están formadas por una capa de carbono gráfico, que pueden contener trazas de metales. La presencia de metales y otras impurezas, aunque en pequeñas cantidades, pueden suponer un riesgo para futuras aplicaciones biológicas para este materia[Liu K.K., 2007]. Afortunadamente los estudios realizados de citotoxicidad de las DNPs han revelado que las nanopartículas de diamante no presentan citotoxicidad en células [Liu K.K., 2007; Schrand, 2007], lo que sienta las bases para futuros estudios sobre las posibles aplicaciones biológicas de las DNPs, teniendo en cuenta que se debe estudiar la toxicidad y biocompatibilidad en cada caso. [Turcheniuk, 2017].

Esto es una ventaja frente a otros nanomateriales de carbono, como los nanotubos de carbono y los fulerenos C60 presentan cierta citotoxicidad [Jia, 2005; Cui, 2005; Smart, 2006; Warheit, 2006], siendo más adecuadas para su uso en aplicaciones biomédicas [Mochalin, 2012].

1.3.3.3. Afinidad de las DNPs por biomacromoléculas

En la bibliografía se encuentran varios estudios que prueban la gran afinidad de las DNPs por biomacromoléculas, como proteínas [Bondar', 2004; Kong, 2005a; Steinmuller-Nethl, 2006; Huang H.J., 2008a; Wang H.D., 2011], enzimas [Chung, 2006; Nguyen, 2007], anticuerpos [Huang T.S., 2004] y péptidos [Kong, 2005b]. Estos trabajos ponen de manifiesto el gran potencial de las DNPs para su modificación con biomacromoléculas. Además, las DNPs, especialmente las obtenidas mediante detonación, poseen una elevada área superficial, debido a su pequeño tamaño y, por tanto, una elevada capacidad de adsorción. Además de gran cantidad de grupos funcionales oxigenados en su superficie y un centro

formado por carbono diamante químicamente inerte. Los grupos funcionales oxigenados presentes en la superficie pueden ser modificados por métodos físicos o químicos, lo que abre nuevas posibilidades de inmovilización de biomacromoléculas. Todas estas propiedades hacen de las nanopartículas de diamante un excelente candidato para la formación de bioconjugados con biomacromoléculas.

En resumen, las DNP_s presentan excelentes propiedades incluyendo elevada área superficial, grupos funcionales oxigenados presentes en su superficie, y un centro de carbono sp^3 (tipo diamante) altamente inerte [Huang H.J., 2008b; Krueger, 2008c]. Debido a su carácter inerte presentan una gran biocompatibilidad que ha sido demostrada en estudios previos [Puzyr, 2007; Krueger, 2008b; Krueger, 2008c]. Además, las investigaciones sobre su citotoxicidad revelan que no es citotóxico para células mientras que otros materiales de carbono si presentan cierto grado de toxicidad [Warheit, 2006; Schrand, 2007]. Todas estas propiedades hacen de ellas unas excelentes plataformas para la formación de bioconjugados y la inmovilización de biomacromoléculas [Kong, 2005a].

En este trabajo se ha aprovechado la buena afinidad de las DNP_s con las biomacromoléculas, en concreto con las enzimas para el desarrollo de biosensores 2D y 3D mediante atrapamiento en una red tridimensional tipo sol-gel.

1.3.3.4. Aplicaciones de las DNP_s

El desarrollo de nuevas plataformas para la inmovilización de sustancias biológicamente activas es un área de gran interés [Krueger, 2008d].

Hasta el momento, las plataformas para la inmovilización de sustancias biológicas han utilizado partículas de silica, oro y óxido de hierro, superficies de vidrio, entre otros [Krueger, 2008d] pero hay muy pocas aplicaciones respecto a las DNP_s en este sentido. Sin embargo, las propiedades descritas anteriormente muestran que las

DNPs son un material muy prometedor para el desarrollo de nuevas plataformas para la inmovilización de sustancias biológicamente activas [Krueger, 2008d]. En este sentido existen trabajos previos, como el de Ushizawa y col. [Ushizawa, 2002], que demuestran que la superficie de polvo de diamante, de 1-2 μm , se puede funcionalizar con ADN a través de la fosforilación de la terminación 5' de los productos de PCR, así como por enlaces de hidrógeno entre los residuos de adenina y timina.

En este sentido, las aplicaciones en biosensores y como biomarcadores constituyen los campos de mayor estudio en la aplicación de las DNPs. Kong y col. [Kong, 2005a], emplean nanodiamante oxidado por tratamiento ácido para la concentración de una disolución de proteínas diluidas para su análisis por espectrometría de masas. La capacidad de inmovilizar anticuerpos sobre las DNPs para la detección de bacterias ha sido demostrada por Huang y col. [Huang T.S., 2004]. En este trabajo, la inmovilización de los anticuerpos de la anti-salmonela y anti- *Staphylococcus aureus* sobre DNPs hidrogenado depositado sobre sustrato de silicio, aporta un gran aumento en la eficiencia de enlace con la bacteria frente a las DNPs no modificadas con el anticuerpo.

Además del potencial para su aplicación en biosensores, las DNPs son también muy prometedoras como biomarcadores. Estudios de sus propiedades ópticas han revelado que hay más de 100 tipos de defectos luminiscentes sobre el diamante [Gruber, 1997]. Entre todos estos defectos, los centros N-V son unos de los más estudiados, pues les dotan de interesantes propiedades luminiscentes [Harley, 1984; Reddy, 1987; Chang, 2008] y consisten en la sustitución de un átomo de nitrógeno por una vacante [Loubser, 1978]. Además, también pueden producirse DNPs que emiten en distintas franjas del espectro [Crossfie, 1974; Gaebel, 2004]. Todas estas propiedades, unidas a la biocompatibilidad y afinidad por las

biomacromoléculas, hacen de las DNP's una buena alternativa como biomarcadores fluorescentes.

El dopaje de las DNP's con ciertos átomos es otro reto tecnológico importante, ya que pueden aportar diferentes propiedades como fluorescencia, en el caso del dopaje con nitrógeno o conductividad tipo-p, en el caso de dopaje con boro. En concreto, se ha conseguido la producción a gran escala de DNP's dopadas con boro (DNP'sB) [Ekimov, 2015; Kondo, 2015]. El mayor problema asociado a la producción de DNP'sB es asegurar que el contenido en boro es suficientemente alto para aportar conductividad a la nanopartícula. Al menos es necesario un 1 o 2% del contenido en peso para aportar conductividad [Nunn, 2017].

1.3.4. Otros nanomateriales. Óxido de zinc (ZnO)

El óxido de zinc es un material semiconductor que presenta un “band gap” o salto de banda de aproximadamente 3.3 eV. Se puede encontrar en dos estructuras cristalinas: wurtzita hexagonal y blenda cubica. La estructura wurtzita es la estructura más estable en condiciones ambientales, mientras que la estructura blenda necesita condiciones de alta presión [Morkoç, 2009].

La estructura de la wurtzita (figura I5) se puede describir como una serie de planos alternativos de átomos de Zn^{2+} y O^{2-} coordinados de forma tetraédrica y apilados a lo largo del eje vertical. La estructura no es centrosimétrica, lo que le confiere propiedades piezoeléctricas al ZnO.

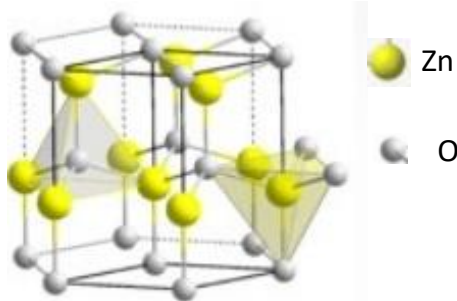


Fig. I5. Estructura cristalina tipo wurtzita del ZnO [Zhang Y., 2012].

El ZnO puede crecer preferentemente a lo largo de tres direcciones: $\langle 10\bar{1}0 \rangle$, $\langle 1\bar{1}210 \rangle$ y $\langle 0001 \rangle$. Si crece en las dos primeras direcciones forma estructuras con forma de cinturón, mientras que si crece a lo largo de $\langle 0001 \rangle$ produce nanohilos (NWs).

1.3.4.1. Síntesis de nanohilos de ZnO (ZnO NWs)

Los métodos de síntesis de nanohilos de ZnO se pueden clasificar en dos grupos: síntesis en fase líquida y síntesis en fase vapor.

La síntesis en fase líquida no requiere el empleo de sistemas de vacío y se pueden obtener diferentes estructuras cambiando los parámetros experimentales, lo que la convierte en un sistema barato y versátil para la síntesis de nanoestructuras de ZnO. Normalmente estos métodos se llevan a cabo en medio acuoso, entonces se le denomina método de crecimiento hidrotérmal [Kim J.Y., 2011]. En la síntesis hidrotérmal los reactivos se mezclan en disolución acuosa y se introducen en un autoclave. Se aumenta la temperatura hasta la temperatura de reacción y, después, los productos son lavados y secados. La disolución contiene una sal de Zn (ZnCl_2 , $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, etc.) y una base (NaOH , KOH , etc.). El mecanismo incluye la reacción química de la sal con el álcali para formar hidróxidos de Zn. El hidróxido se descompone a altas temperatura en ZnO y agua. En algunos procedimientos, se

introduce en la disolución un sustrato con una lámina de ZnO para favorecer el crecimiento sobre él [Hu, 2007; Li X., 2015].

La síntesis en fase vapor es el método más empleado para la formación de nanoestructuras 1D [Yi, 2005]. Los métodos de síntesis en fase vapor incluyen el transporte en fase vapor (VPT) [Petersen, 2009], deposición por láser pulsado (PLD) [Tien, 2008], el transporte químico en fase vapor (CVT) [Protasova, 2011], entre otros [Zhang Y., 2012].

El transporte en fase vapor (VPT) puede desarrollarse a través de dos vías: vapor-sólido (VS) y vapor-líquido-sólido (VLS). En VLS, se depositan sobre un sustrato un array de nanoestructuras metálicas (Au, Ag, etc) por deposición o por evaporación de láminas finas metálicas. El sustrato y la fuente de Zn se introducen dentro del horno. Durante el proceso de calentamiento las nanoestructuras se convierten en gotas líquidas. Estas gotas actúan como captadores de las especies de vapor de Zn y O₂ reaccionando dentro de la gota para formar ZnO cuando la gota esta sobresaturada, la nucleación de ZnO sólido ocurre y comienzan a crecer los nanohilos [Yang P., 2002; Li S.Y., 2003; Kim S.M., 2010].

En VS la fuente de Zn y el sustrato de crecimiento se ponen en un recipiente y se introduce en el horno. El Zn y el O₂ reaccionarán para formar moléculas de ZnO que cristalizan sobre la superficie del sustrato. En el crecimiento VS se puede depositar previamente una lámina de semillas de ZnO sobre el sustrato de crecimiento para ayudar al crecimiento de los nanohilos [Conley, 2005]. Esta lámina forma sitios de nucleación y guía los nanohilos a lo largo de la dirección <0001>. La principal ventaja de este método es que los nanohilos pueden crecer sin necesidad de un catalizador metálico.

La deposición por láser pulsado (PLD) es una técnica de deposición física empleada para la síntesis de capas finas y nanoestructuras. Un láser de alta potencia emite

pulsos a una cierta frecuencia sobre el material semiconductor puro, en este caso el ZnO, situado dentro de un compartimento a alto vacío. Los pulsos del láser vaporizan los átomos del material (ablación) formando un plasma que interacciona física y químicamente con el ambiente. Finalmente, el material se condensa sobre el sustrato de crecimiento, formando nanohilos. La ventaja de este método es que no requiere ningún disolvente químico que pueda dejar residuos y contamine los nanohilos. Sin embargo, este método no es escalable, por lo que no puede usarse para síntesis a gran escala [Rahm, 2007; Tien, 2008].

El método de transporte químico en fase vapor (CVT) se compone de tres pasos: 1) evaporación térmica de los precursores sólidos, formando una fase vapor, 2) transporte de esta fase vapor por un gas transportador y, 3) cristalización de la fase vapor en la zona de condensación. La evaporación de los precursores se lleva a cabo en la zona de evaporación donde la temperatura es superior a su punto de fusión, mientras que la cristalización se da en una zona donde la temperatura es mucho menor. Para el transporte de la fase vapor entre ambas zonas normalmente se emplea un elemento cuyas moléculas son más grandes que el material transportado. El principal papel de este gas transportador es asegurar el flujo laminar de la fase vapor previniendo la formación de turbulencias, permitiendo así la formación de una capa uniforme en la zona de condensación. En la figura I6 se presenta el esquema del sistema CVT. Este es el método empleado para la síntesis de los nanohilos de ZnO empleados en este trabajo.

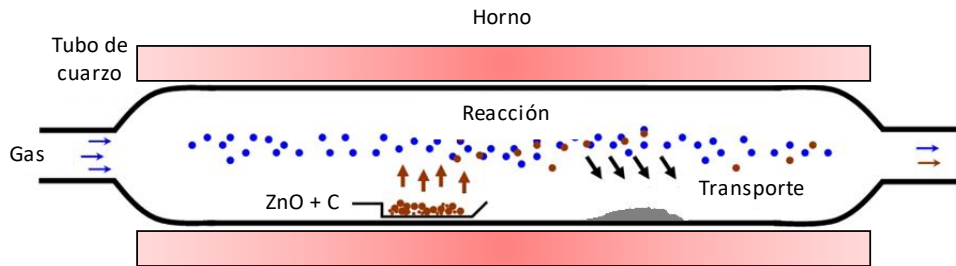
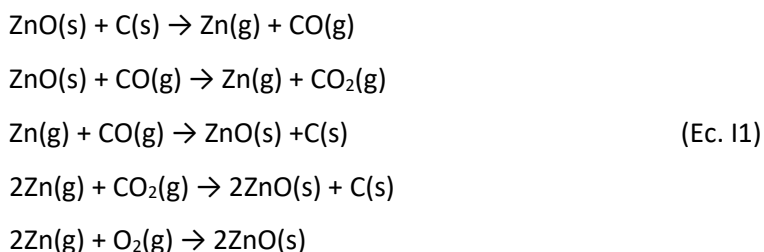


Fig. I6. Esquema del método de transporte químico de vapor (CVT).

El precursor metálico sólido se deposita en un crisol cerámico localizado en la zona de evaporación bajo un flujo de argón de 100 sccm (centímetro cúbico estándar por minuto/ standard cubic centimeters per minute) con el objetivo de evitar la oxidación del metal.

El ZnO tiene un elevado punto de fusión, de 1975°C. El tubo de cuarzo del sistema sólo alcanza los 1000°C por lo que no se puede evaporar directamente. Por esto en primer lugar se realiza una reducción del ZnO empleando grafito a temperaturas moderadas de 900°C, produciendo vapor de Zn siguiendo las siguientes ecuaciones:



La mezcla se hace manteniendo un ratio ZnO:C de 1:1. Con el objetivo de obtener una distribución homogénea de C y ZnO y aumentar la eficacia de la reducción se disuelve la mezcla en etanol y se sonica durante una hora. Después se calienta la disolución durante 1 hora a 90°C en un horno para eliminar el solvente orgánico.

Tanto el Zn como el ZnO:C se ponen en un crisol de cerámica en el centro del tubo de cuarzo a temperatura ambiente. Previo al aumento de temperatura, un flujo de Ar de 100 sccm se aplica durante 30 minutos para evacuar todo el gas que hay dentro del tubo. Después, la temperatura aumenta hasta la temperatura de crecimiento, entre 700°C y 900°C., manteniendo el flujo de Ar. Una vez alcanzada la temperatura, la válvula del O₂ se abre manteniendo el flujo de Ar. La fase vapor de Zn se crea o por evaporación directa del Zn (que tiene punto de fusión de 400°C y punto de ebullición de 900°C a 1 atm) o por la reducción térmica de la mezcla ZnO:C, y es transportado por el gas Ar y finalmente reacciona con el O₂ en la zona de condensación, donde la temperatura es de aproximadamente 200°C menos que en la zona de evaporación. En las paredes del tubo de condensación se deposita polvo de ZnO.

1.3.4.2. Propiedades del ZnO

•*Propiedades eléctricas*: el ZnO tiene un salto de banda relativamente amplio de aproximadamente 3,3 eV a temperatura ambiente lo que conlleva altos voltajes de descomposición, habilidad de mantener amplios campos eléctricos, bajo ruido electrónico, y altas temperaturas y altas potencias de operación. Casi todo el ZnO tiene el carácter tipo n, incluso sin agregar impurezas. La movilidad de los electrones del ZnO varía fuertemente con la temperatura y tiene un máximo de aproximadamente 2000 cm²/(V·s) a 80 K. Los datos de movilidad de los huecos son escasos con valores en el rango de 5–30 cm²/(V·s) [Ryu, 2003].

•*Propiedades mecánicas*: el módulo de Young representa uno de los parámetros más importantes que describe las propiedades mecánicas de los nanohilos. Este módulo fue medido por Jiang y col. por compresión de un solo nanohilo de diámetro 70 nm con una punta de AFM, obteniendo un valor de 140 GPa, similar a los observados para películas de ZnO [Jiang, 2014]. Por otro lado, la dependencia

del módulo de Young con el diámetro de los nanohilos fue estudiada por Chen y col. [Chen, 2006]. Se observó una reducción en el módulo, de 220 a 140 GPa, para diámetro desde 17 a 550 nm. Estos altos valores del módulo de Young hacen de los nanohilos de ZnO un material prometedor para la fabricación de nanocantilevers y nanoresonadores.

•*Propiedades fotoluminiscentes*: los nanohilos de ZnO presentan una banda intensa a 375 nm que se atribuye a la banda de emisión del UV cercano, “near band edge” o emisión de banda cercana (NBE) [Huang M.H., 2001]. Además, presentan una banda adicional ancha en la región del espectro visible, denominada “deep level emission” o emisión de centros profundos (DLE), a aproximadamente 520 nm (región del verde) a una temperatura de 10 K, como describen Liao y col. [Liao, 2008].

1.3.4.3. Aplicaciones del ZnO

El ZnO es un material muy estudiado debido a su versatilidad en diferentes aplicaciones tecnológicas gracias a sus propiedades semiconductoras [Natsume, 1995; Nomura, 2003; Özgür, 2005]. Dentro de las ventajas más significativas de este material está la posibilidad de producir sustratos nanoestructurados mediante el crecimiento de nanohilos orientados lo que aporta una mayor superficie específica en comparación a la de láminas delgadas depositadas por medios convencionales. Presenta luminiscencia intrínseca, que se encuentra en la región del ultravioleta, aunque en muchas ocasiones aparece luminiscencia en la zona del verde del espectro electromagnético, que comúnmente es atribuida a defectos puntuales del cristal como vacantes y átomos intersticiales [Klingshirn, 2010].

Otra de las características más destacables del ZnO es su biocompatibilidad, que ha llevado a aplicarlo con éxito a la detección de moléculas biológicas y a ser considerado como un material prometedor en el desarrollo de biosensores [Sun,

1999; Kang, 2005; Wei A., 2006; Kumar, 2006; Kim J.S., 2006]. Su elevado punto isoelectrico (9.5) proporciona un sustrato cargado positivamente lo que favorece la formación de bioconjugados por interacción electrostática con proteínas con un punto isoelectrico inferior, como algunas enzimas (lactato oxidasa).

1.4. Aplicación de biosensores a la determinación de analitos de interés

Como se ha mencionado anteriormente, la utilización de enzimas como elemento de reconocimiento biológico en un biosensor permite la determinación selectiva de un gran número de analitos de interés. Así, por ejemplo, la determinación de glucosa o de lactato presentan una gran importancia tanto en medicina como en otros sectores, como el de la alimentación.

1.4.1. Glucosa

El aumento de los niveles de glucosa en sangre, por fallo en su regulación, da lugar a una serie de complicaciones en distintos órganos y a la aparición de enfermedades como la diabetes. Por esto es muy importante su determinación, ya que es útil para el diagnóstico de numerosas enfermedades metabólicas.

La glucosa es el monosacárido más abundante en la naturaleza. Es soluble en agua, pero insoluble en alcohol. Tiene apariencia cristalina y blanca [Badu, 1999]. La glucosa, disuelta en agua puede encontrarse como uno de sus tres isómeros, α -glucosa, β -glucosa y δ -glucosa [Galant, 2015]. La forma más estable de la glucosa es su forma cíclica [Largeaud, 1995] ya que a temperatura ambiente y en el equilibrio los isómeros se presentan en una relación 37:63:0.003 para α -, β - y δ -glucosa respectivamente [Galant, 2015]. Es el combustible principal para la glucólisis y es responsable de generar gran parte de la energía necesaria para el crecimiento [Galant, 2015], por lo que es uno de los compuestos biológicos más

importantes para la vida. Además, está relacionado con enfermedades como la diabetes mellitus, la glicosuria renal y la fibrosis quística, por lo que su detección y cuantificación en fluidos fisiológicos ha sido ampliamente estudiada [Wang J., 2008].

1.4.1.1. Biosensores electroquímicos de glucosa

La detección y cuantificación de glucosa se lleva a cabo en la gran mayoría de los casos empleando biosensores, debido a la gran sensibilidad y selectividad que presentan. En concreto, la glucosa oxidasa (GOx) es una de las enzimas más empleadas para el desarrollo de biosensores de glucosa.

La enzima glucosa oxidasa (GOx) es una proteína globular ligeramente alargada (figura 17), que cataliza la oxidación de glucosa a gluconolactona y peróxido de hidrógeno. Tiene un diámetro promedio de 8 nm [Bourdillon, 1980], un peso molecular de aproximadamente 155 ± 5 KDa [Wellner, 1967] y un pH óptimo de 5.5 [O'Malley, 1972]. Es una proteína dimérica, formada por dos subunidades idénticas donde cada unidad se pliega en dos dominios: uno para enlazar el sustrato (β -D-glucosa) y otro en el que se encuentra unido de forma no covalente el cofactor, el Flavín adenín dinucleótido (FAD). El FAD constituye el centro activo donde tiene lugar la reacción de oxidación de la glucosa y está formado por grupos amino que tiene un papel importante en su actividad catalítica [Raba, 1995; Ferri, 2011].

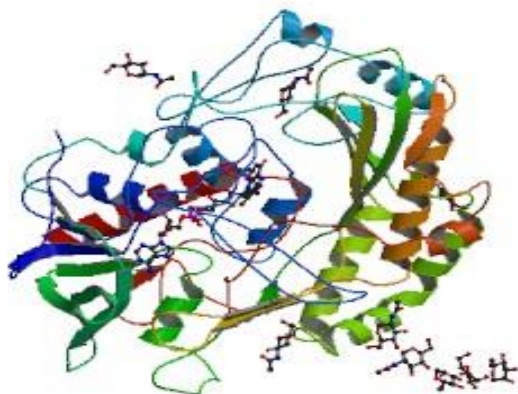
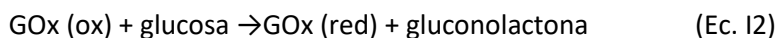


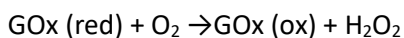
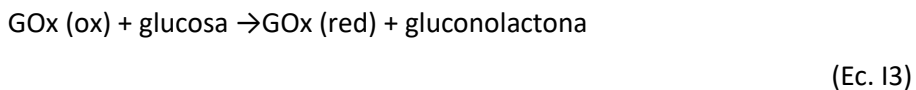
Fig. 17. Estructura de la enzima glucosa oxidasa.

Esta flavoproteína cataliza la reacción de la glucosa a gluconolactona [Wang J., 2008] según la ecuación 12.



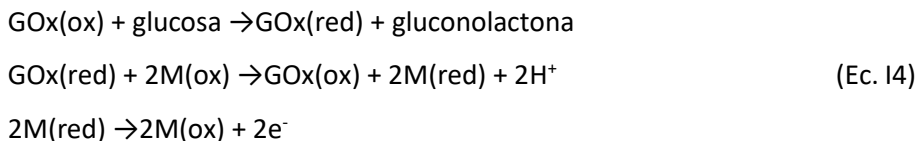
Los biosensores desarrollados para la determinación de glucosa se clasifican en tres tipos según el cofactor utilizado para oxidar la GOx (red) a su estado inicial GOx (ox) [Fu, 2009; Shan, 2009].

- Biosensores de primera generación: están basados en el uso del O_2 , cofactor natural, para regenerar el estado inicial de la enzima GOx (ox), con la consecuente generación de H_2O_2 , ecuación 13:



Por tanto, estos biosensores determinan la concentración de glucosa mediante cuantificación del O₂ consumido o de H₂O₂ generado, que puede medirse mediante oxidación o reducción electroquímica.

•Biosensores de segunda generación: en este caso el O₂ es sustituido por un aceptor de electrones, cofactor o mediador, ecuación I4. Este cofactor ha de poseer la capacidad de transportar electrones desde el centro redox de la enzima a la superficie del electrodo, ya que la transferencia directa de los electrones entre la GOx y los electrodos no es posible, debido al gran tamaño de la GOx y a las diversas cadenas de su estructura que actúan de barrera.



Emplear un cofactor adecuado es imprescindible en este tipo de biosensores debido a que la transferencia en los sitios activos de la GOx y la superficie del electrodo es el factor limitante en los biosensores amperométricos de glucosa. El ferroceno, ferrocianuro, sales orgánicas conductoras, compuestos quinona y complejos con metales han sido empleaos con éxito en el desarrollo de biosensores de glucosa de segunda generación [Boujtita, 1996; Parra-Alfambra, 2006a]

En concreto en este trabajo se han desarrollado biosensores de segunda generación empleando el hidroximetil ferroceno (HMF) como mediador en disolución. El HMF actúa como mediador redox, transformándose en cada ciclo catalítico de HMF(II) a HMF(III) y, por tanto, será el potencial redox de este sistema el que marque el potencial de respuesta del biosensor, siendo la magnitud de la corriente catalítica la señal analítica utilizada en la determinación de la concentración de lactato.

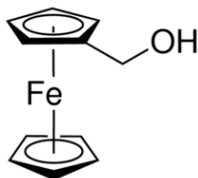


Fig. I8. Estructura del hidroximetil ferroceno (HMF).

•Biosensores de tercera generación: en estos biosensores se pretende eliminar el uso de mediadores y desarrollar sistemas sin ningún cofactor adicional que pueda operar a bajos potenciales, cercanos al potencial redox de la enzima. En estos sistemas, el objetivo es conseguir la transferencia electrónica directa de los electrones entre el centro activo de la GOx y la superficie del electrodo. De este modo se conseguirá mejorar la selectividad del dispositivo, eliminando las interferencias debidas a la presencia de otros compuestos. Sin embargo, aún se investiga el desarrollo de nuevas estrategias de funcionalización e inmovilización para evitar las dificultades de la transferencia de electrones entre el enzima y el electrodo debidas a los impedimentos espaciales de la enzima. Actualmente no hay una conclusión clara sobre si esta transferencia directa de electrones es o no posible, aunque los trabajos más recientes apuntan a que no [Fu, 2009; Gilson, 2016].

1.4.2. Lactato

La determinación de lactato, o ácido láctico, es de gran importancia en diferentes aplicaciones como el diagnóstico de enfermedades, en la industria alimentaria [De Luca, 2005], bebidas y fermentación [Zaydan, 2004], en medicina clínica [Volpe, 1995; Bakker, 1996; Hart, 2004] y en medio ambiente [Stephens, 1997].

La variación en los niveles normales de este analito en sangre se utiliza como indicador en el diagnóstico de pacientes en procesos de cuidados intensivos y

operaciones quirúrgicas, ya que está relacionado con la presencia de diferentes patologías como choque cardiogénico, fallo respiratorio, enfermedades hepáticas, y la diabetes mellitus, entre otras [N. G. Patel, 2000; Burmeister, 2005].

En medicina deportiva el lactato también es un analito de interés para la estimación de las condiciones físicas de los deportistas. La concentración de lactato en sangre durante el ejercicio puede aumentar desde 0.5 y 1.5 mM, valores normales de individuos sanos en reposo, hasta 12.0 mM [Stanley, 1985]. Si se realiza un ejercicio excesivo los valores de lactato pueden aumentar hasta superar la capacidad de tamponamiento de las células, es el denominado umbral láctico, provocando procesos de acidosis láctica que puede afectar al funcionamiento de los músculos. Este umbral láctico es un indicador que se emplea para determinar el nivel de entrenamiento de un atleta [Kemp, 2005].

El nivel de lactato en la industria alimentaria es un indicador de los procesos de fermentación y está relacionado con la frescura, la estabilidad y la calidad del almacenamiento de productos como salsas de tomate [Porretta, 1993], fruta, zumos, vino y leche [Socol, 1994].

Por esto, el desarrollo de métodos sensibles y fiables para su determinación es de gran interés. Existen distintos métodos convencionales para determinar la concentración de lactato, en distintos tipos de muestras. Estos están basados en el análisis cromatográfico y el ensayo colorimétrico [Madrid, 1999]. El principal inconveniente de muchos de estos métodos analíticos convencionales es que son lentos, ya que requieren en muchos casos un pretratamiento laborioso de la muestra. Por tanto, sigue siendo de gran interés el desarrollo de métodos alternativos que sean simples, directos y que permitan medidas en tiempo real para la detección de ácido láctico.

1.4.2.1. Biosensores electroquímicos de lactato

Los biosensores se presentan como una buena alternativa a los métodos convencionales ya que permiten llevar a cabo medidas de un modo simple y reproducible, reduciendo los tiempos de análisis. Además, la elevada especificidad de los sistemas biológicos, junto con la transducción electroquímica, permiten la medida directamente en la muestra, independientemente de su complejidad, permitiendo obtener la información requerida de forma rápida y sin análisis complejos.

Existen en la bibliografía diferentes biosensores electroquímicos para la determinación de lactato [Nikolaus, 2008]. Estos biosensores emplean diferentes electrodos previamente modificados o no. Los más utilizados son los metálicos (platino, oro y, en menor medida, óxidos metálicos), y los basados en carbono, como los de pasta de carbono, carbón vítreo o grafito. Recientemente también los basados en nanomateriales como grafeno [Casero, 2013] y nanotubos de carbono [Pérez, 2012]. Respecto a los elementos de reconocimiento, se han empleado células [Garjonyte, 2006], bacterias [Plegge, 2000] y principalmente enzimas. En este último caso, las enzimas más empleadas para el desarrollo de biosensores electroquímicos son la lactato deshidrogenasa (LDH) [Shu, 2001; Jena, 2007], la lactato oxidasa (LOx) [Parra-Alfambra, 2006a; Romero, 2008; Yashina, 2010] y, en menor medida, el citocromo b2 (Cyt b2) [Staskeviciene, 1991].

En el desarrollo de esta tesis doctoral se ha empleado la enzima lactato oxidasa para el desarrollo de biosensores de lactato.

La enzima lactato oxidasa (LOx) (figura I9) pertenece a la familia de las flavoproteínas, es decir, incorpora un cofactor de tipo flavina fuertemente enlazado en su estructura cuya interacción con el sustrato es la responsable de la gran especificidad de esta enzima por el lactato. Está formada por dos tetrámeros

empaquetados en una unidad asimétrica [Leiros, 2006]. Cada tetrámero forma una unidad biológicamente activa y tiene un peso molecular de 80 kDa.

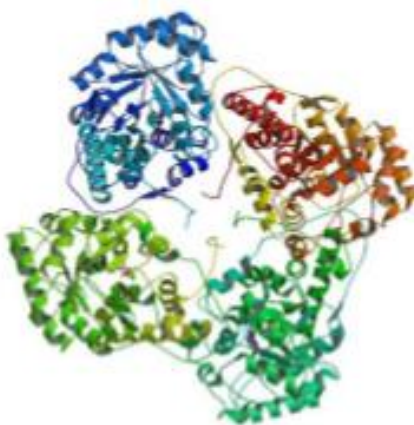
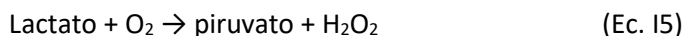
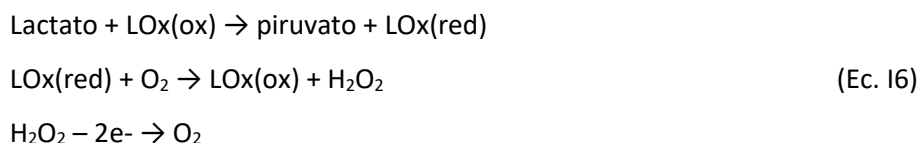


Fig. I9. Estructura de la enzima lactato oxidasa.

La enzima lactato oxidasa (LOx) cataliza la oxidación de lactato a piruvato y peróxido de hidrógeno según la siguiente reacción:

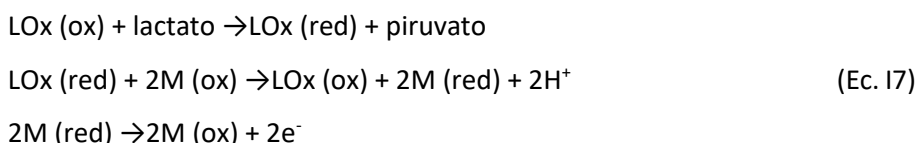


Normalmente la detección de lactato se lleva a cabo mediante la monitorización del consumo de O_2 [Makovos, 1985] o de la producción de H_2O_2 [Lamas-Ardisana, 2014; Loaiza, 2015], donde el O_2 actúa como mediador natural, biosensores electroquímicos de primera generación, según las siguientes reacciones:



Sin embargo, tanto la reducción de O_2 , como la oxidación de H_2O_2 requieren sobrepotenciales muy elevados, lo que conlleva serios problemas de interferentes.

Para evitar esto existen distintos métodos, entre los que destaca la sustitución del aceptor natural de electrones (O_2) por un mediador redox, los denominados biosensores electroquímicos de segunda generación. Como se ha comentado anteriormente, los biosensores electroquímicos de segunda generación utilizan mediadores de transferencia de carga para facilitar la transferencia de los electrones desde la enzima hasta la superficie del electrodo. La enzima, reducida tras la oxidación del lactato, se regenera a través del mediador redox, y este, se regenera a su vez sobre el electrodo mediante una reacción electroquímica siguiendo la ecuación 17. En este caso el potencial de trabajo del electrodo corresponde al potencial formal del mediador, reduciendo así el sobrepotencial necesario para la determinación de lactato.



En la bibliografía se encuentran descritos biosensores basados en la enzima lactato oxidasa que emplean como mediadores polímeros conductores [Kenausis, 1996; Khan G.F., 1997], complejos de metales de transición [Park, 1997], derivados del ferroceno [Boujtita, 1996; Parra-Alfambra, 2006b], o colorantes orgánicos [Kulys, 1993; Marzouk, 1997; Pereira, 2011]. Sin embargo, debido a la importancia de este analito, sigue existiendo un gran interés en el desarrollo de nuevos dispositivos biosensores que permitan mejorar las propiedades analíticas, sobretudo en términos de sensibilidad y estabilidad, de los ya descritos.

El trabajo llevado a cabo en esta tesis se ha centrado en el desarrollo de nuevos biosensores 2D y 3D electroquímicos de lactato con propiedades mejoradas.

2. MÉTODOS ÓPTICOS PARA LA DETECCIÓN DE LACTATO

Los cambios en la luminiscencia de nanopartículas o de semiconductores pueden usarse para la determinación de diferentes analitos [Steiner, 2011; Wilhelm, 2014]. La funcionalización del semiconductor con un material que sea sensible sólo al analito infiere selectividad al ensayo [Yakimova, 2012]. Puesto que las reacciones biológicas exhiben una alta especificidad hacia sus respectivos sustratos, estas pueden ser excelentes candidatos para esta finalidad.

Entre los materiales fluorescentes utilizados en estos ensayos ópticos destacan los materiales semiconductores básicos, como Si, SiC, GaN, y óxidos metálicos [Selegård, 2010; Shi, 2014]. Dentro de estos últimos, el ZnO presenta un amplio salto de banda (3.3 eV), lo que le permite tener luminiscencia a temperatura ambiente [Khranovskyy, 2010; Khranovskyy, 2012a] y posee un punto isoeléctrico de 9.5, lo que favorece la inmovilización de enzimas que tienen un menor punto isoeléctrico, ≤ 5 , de forma eficiente [Wei Y., 2010]. Además, es biocompatible y forma una gran variedad de estructuras que le aportan una alta relación superficie-volumen y una alta cristalinidad [Elias, 2012; Raghavan, 2012; Khranovskyy, 2012b; Chaaya, 2014a].

Todas estas propiedades hacen del ZnO un buen candidato para su empleo en el desarrollo de métodos ópticos para la determinación de analitos de interés en distintas áreas [Khranovskyy, 2012b; Chaaya, 2014b] y también se ha utilizado para potenciar el efecto de algunos fluoróforos.

Los primeros en emplear este material en un bioensayo fueron Dorfman y col. En este trabajo el ZnO aumenta la capacidad de detección de la fluorescencia de ADN marcado con un fluoróforo y de la proteína IgG, comparado con otros sustratos usados comúnmente [Dorfman, 2006]. Desde entonces, las técnicas ópticas de bioensayo empleando ZnO han ido en aumento y han encontrado aplicación en

inmunoensayos y diagnóstico clínico. Por ejemplo, se han descrito inmunoensayos empleando nanoestructuras bifuncionalizadas $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZnO}/\text{Au}$ como sondas Raman [Hong, 2010] e inmunoensayos empleando ZnO quantum dots como marcadores fluorescentes, por ejemplo, para la detección de biomarcadores del cáncer como el antígeno carbohidrato CA 19.9, marcador empleado en la detección del cáncer pancreático [Gu, 2011].

Como se ha comentado anteriormente en esta memoria, uno de los biomarcadores de gran interés en muchos ámbitos como el de la medicina, la medicina deportiva y el control alimentario, entre otros, es el lactato. Por este motivo, existe un gran interés en el desarrollo de métodos específicos, sensibles, de fácil manejo y de bajo coste para la determinación de este analito. En este sentido, se han desarrollado distintos métodos, amperométricos [Nikolaus, 2008], potenciométricos [Shinbo, 1979], cromatográficos [Omole, 1999], fluorimétricos [Galbán, 1993], etc., para su determinación. Entre ellos, los métodos ópticos destacan porque aportan una mayor simplicidad y portabilidad. Estos métodos pueden estar basados tanto en la monitorización del consumo de un reactivo o de la formación del producto de una determinada reacción base [Choi, 2004].

El primer método óptico para la detección de lactato en sangre basado en la absorción de luz fue descrito por Broder y Weil en 1964 [Broder, 1964]. Sin embargo, a lo largo de los años, las técnicas de fluorescencia han ido sustituyendo a las técnicas de absorbancia, ya que permiten obtener límites de detección más bajos. Estas técnicas se basan en la medida de la luminiscencia emitida por una muestra que previamente ha sido excitada por una fuente de luz. Los analitos con capacidad luminiscente responden a la luz incidente, de una longitud de onda concreta, emitiendo a otra longitud de onda, con una intensidad de luminiscencia que depende de la concentración del analito. Por tanto, a mayor concentración de analito más intensa será la luminiscencia [Choi, 2004].

Sin embargo, algunos de estos métodos ópticos están basados en la disminución de la fluorescencia, producida por un cambio en el sistema estudiado [*De Marcos, 1995; Groegel, 2011*]. Esta disminución en la intensidad de fluorescencia, llamada efecto “quenching” o de amortiguación, puede deberse a distintos procesos. Entre ellos, la amortiguación por colisión se da cuando el estado excitado de un fluoróforo se desactiva en contacto con otra molécula en disolución, llamado amortiguador. También, se puede producir este efecto por la formación de complejos no fluorescentes entre el fluoróforo y el compuesto amortiguador. Existe una gran variedad de moléculas que pueden actuar provocando la amortiguación de la fluorescencia, entre ellas el oxígeno molecular, las aminas alifáticas y aromáticas, el peróxido de hidrógeno, etc. [*Lakowicz, 2006*].

En el desarrollo de métodos fluorescentes para la determinación de lactato utilizando un ensayo enzimático, la enzima empleada más comúnmente es la lactato deshidrogenasa, debido a las propiedades fluorescentes que presenta su coenzima, el NADH, que absorbe la luz a una longitud de onda alrededor de 340 – 360 nm y emite fluorescencia a una longitud de onda de alrededor de 450 – 460 nm. Así, la intensidad de la luz a 460 nm es proporcional a la concentración de NADH y, por lo tanto, a la cantidad de sustrato (lactato) [*McComb, 1976; Duchon, 1992*].

Aunque existen en la bibliografía trabajos en los que emplean la LOx como elemento de reconocimiento en métodos ópticos para la detección de lactato [*Rassaei, 2014*], no hay descrito ningún método óptico que utilice esta enzima basado en la fotoluminiscencia del ZnO. Por tanto, en el trabajo de esta tesis doctoral se han querido aprovechar las propiedades fotoluminiscentes de los ZnO NWs sintetizados combinado con la selectividad que la enzima proporciona como reactivo de reconocimiento en un bioensayo en el desarrollo de un método óptico para la determinación de lactato.

3. ELECTROQUÍMICA BIPOLAR (BPE)

En los últimos años se ha producido un gran avance en la síntesis controlada de nanopartículas (NPs) con tamaño, forma y composición diferentes [Xia, 2003; Perez-Juste, 2005]. Sin embargo, la creciente demanda de nanomateriales funcionales y su aplicación a dispositivos [Glotzer, 2007; Carbone, 2010] hace necesario el desarrollo de nuevas NPs con estructura y composición más complejas para superar las limitaciones que presentan las NPs simples [Xing, 2010; Costi, 2010; Zou, 2011; Peng, 2011].

En este sentido, las nanopartículas modificadas asimétricamente pueden tener un gran potencial en distintos campos de aplicación como la detección [Hao, 2010] catálisis [Crossley, 2010], nano y optoelectrónica [Nisisako, 2006; Gangwal, 2008], etc. Por ello el desarrollo de métodos que permitan la modificación de nanopartículas de forma asimétrica es de gran interés. Entre estos la electroquímica bipolar es uno de los más interesantes. Se trata de una técnica que genera una reactividad asimétrica en la superficie de objetos conductores, llamados electrodos bipolares (BE), de forma inalámbrica mediante la aplicación de una diferencia de potencial. Se ha aplicado para la modificación de nanopartículas de distinta naturaleza.

Las partículas sometidas a esta técnica presentan distintas propiedades físico-químicas a cada lado, las llamadas partículas Janus. Por tanto, un electrodo bipolar es un material conductor que permite llevar a cabo reacciones electroquímicas en sus extremos, incluso en ausencia de un contacto óhmico directo.

Cuando se aplica un voltaje suficiente a una disolución de electrolito en presencia de un electrodo bipolar, inmerso en dicha solución, la diferencia de potencial entre el electrodo bipolar y la disolución de electrolito provoca reacciones de oxidación y reducción. Se pueden controlar un gran número de electrodos con una sola fuente

de energía DC o incluso una batería, ya que no se necesita una conexión eléctrica directa para activar las reacciones redox. Esta técnica permite, entre otras aplicaciones, generar el movimiento de los electrodos bipolares, son los llamados micro-nadadores, que son capaces de moverse libremente en solución [Fosdick, 2013].

Para entender la electroquímica bipolar hay que tener en cuenta que los polos del electrodo bipolar están orientados de forma opuesta a los electrodos que aplican el potencial (figura I10).

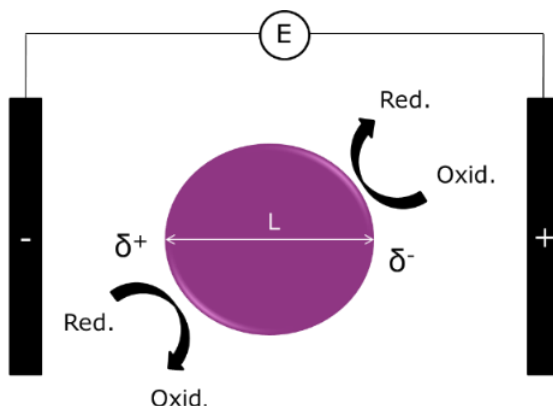


Fig. I10. Mecanismo de oxidación-reducción mediante BPE.

Esto fue demostrado por Manz y col. que depositaron un hilo de Pt en un recipiente lleno con una disolución indicadora de pH [Arora, 2001]. Como se ve en la figura I11a, la aplicación de 30 V entre los electrodos conductores (cables rojo y azul) provoca que el pH de la disolución en el polo positivo del electrodo conductor (ánodo, cable rojo) disminuya (color naranja) debido a la oxidación del agua y, por tanto, a la formación de H^+ . Por otro lado, la reducción del agua en el electrodo conductor negativo (cátodo, cable azul) genera la formación de OH^- , incrementando el pH y observándose el color púrpura de la disolución indicadora.

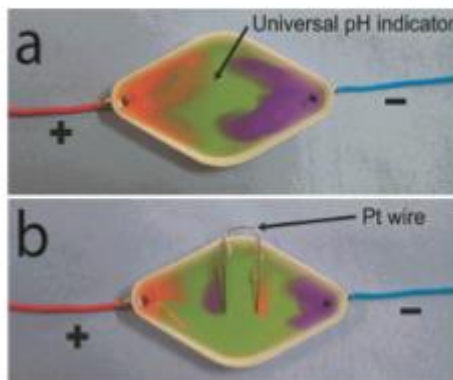


Fig. I11. a) Compartimento de plástico con dos electrodos conductores de Pt sumergidos en una disolución de indicador pH tras la aplicación de un potencial de 30 V, b) compartimento de plástico con dos electrodos conductores de Pt sumergidos en una disolución de indicador pH y con un hilo de Pt en forma de U actuando como electrodo bipolar, tras la aplicación de un potencial de 30 V. Imagen tomada de la publicación [Arora, 2001].

En la figura I11b, un hilo de Pt en forma de U, el electrodo bipolar, se introduce entre los electrodos conductores y el cambio de color de la disolución indicadora de pH demuestra que la electrolisis del agua se produce en sus extremos, aunque no existe contacto directo con la fuente de corriente. Además, la posición relativa de los colores revela que los polos del electrodo bipolar están orientados de forma opuesta a los electrodos conductores.

Las celdas para llevar a cabo electroquímica bipolar pueden configurarse de diferentes formas según las aplicaciones, desde electrosíntesis al microanálisis. En la figura I12 se presenta, como ejemplo, el esquema de una celda a microescala desarrollada por el grupo de R. M. Crooks.

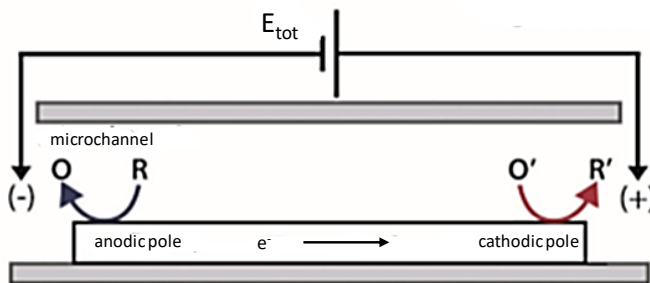


Fig. I12. Esquema de una celda a microescala. Imagen tomada de la publicación [Fosdick, 2013].

El voltaje aplicado entre los dos electrodos conductores (E_{tot}) da lugar a un campo eléctrico en la disolución que causa que el electrodo bipolar llegue a un potencial de equilibrio (E_{elec}) que depende de la posición del campo y de la composición de la disolución electrolito. Debido a que el electrodo bipolar es un conductor, su potencial (E_{elec}) es el mismo o muy cercano en cualquier parte de su superficie. Sin embargo, el potencial interfacial entre el electrodo bipolar y la disolución varía a lo largo de su longitud debido a la presencia del campo eléctrico en disolución. Son estos sobrepotenciales anódico y catódico [Mavrè, 2009] η_{an} y η_{cat} respectivamente, los que provocan las reacciones electroquímicas en los polos del electrodo bipolar. La magnitud de los sobrepotenciales depende sólo de dos variables experimentales: la magnitud de E_{tot} y la longitud del electrodo bipolar.

Como ya se ha indicado, la magnitud de los sobrepotenciales varía a lo largo de la longitud del electrodo bipolar, presentando el mayor sobrepotencial en sus extremos, en contraste con los electrodos de trabajo en la configuración tradicional de celda de tres bocas, donde, generalmente, la diferencia de potencial interfacial se considera uniforme [Terrill, 2000]. En cualquier caso, es esta diferencia de potencial interfacial lo que da lugar a las reacciones electroquímicas [Duval, 2001]. El campo eléctrico que genera la electroquímica bipolar se aplica generalmente por dos o más electrodos conductores, que pueden ser metálicos (Au, Ag, Pt, etc.),

carbonaceos (carbón vitrificado o grafito) o no polarizable (electrodos de referencia Ag/AgCl). La naturaleza del campo eléctrico formado entre los electrodos conductores depende de la geometría de la celda y de la conductividad del electrolito en disolución.

Entre los parámetros que controlan los procesos de electroquímica bipolar, ya se ha mencionado que están la E_{tot} , la distancia entre los electrodos conductores, $l_{channel}$, y la longitud del electrodo bipolar, l_{elect} . La fracción de E_{tot} que afecta al electrodo bipolar, ΔE_{elec} , puede calcularse usando la ecuación 18 [Duval, 2001; Zhan, 2002; Mavrè, 2010].

$$\Delta E_{elec} = E_{tot} \frac{l_{elect}}{l_{channel}} \quad (\text{Ec. 18})$$

La electroquímica bipolar presenta limitaciones cuando se quiere aplicar a partículas de pequeño tamaño y semiconductoras, ya que el voltaje que se tendría que aplicar (E_{tot}) para poder generar la reactividad asimétrica en el electrodo bipolar sería demasiado elevado.

Combinación de electroquímica bipolar y radiación UV (BPE&UV)

Una alternativa para superar esta limitación de la electroquímica bipolar fue la introducida por Ongaro y col. [Ongaro, 2014]. En su trabajo utilizan por primera vez la modificación asimétrica de nanofibras de TiO_2 con oro empleando luz UV y un campo eléctrico externo. Ongaro y col. asumen que las reacciones redox se dan por activación mediante la radicación con la luz UV mientras que la aplicación del campo eléctrico aumenta la separación de las cargas.

Esta metodología permite superar las limitaciones intrínsecas de ambas técnicas cuando se emplean por separado. Cuando aplicamos un campo eléctrico a la vez

que irradiamos luz sobre el electrodo bipolar, los electrones y los huecos pueden separarse de forma más eficiente, rompiendo así la simetría de las partículas y permitiendo su modificación asimétrica [Tiewcharoen, 2017]. El proceso que se lleva a cabo es el siguiente: cuando un objeto semiconductor absorbe luz con una energía superior a la de su salto de banda (E_g), los electrones de la banda de valencia (VB) saltan a la banda de conducción (CB) dejando huecos. Los electrones (e^-) y los huecos (h^+) migran a la superficie del objeto, pudiendo llevar a cabo reacciones redox en su superficie si el objeto se encuentra en disolución en presencia de una especie redox activa [Tiewcharoen, 2017]. Sin embargo, si al mismo tiempo se aplica un campo eléctrico fuerte esto genera una polarización positiva (δ^+) y negativa (δ^-) en los extremos del objeto semiconductor. Se genera entonces un campo eléctrico interno que facilita la separación de las cargas (pares $e^- - h^+$) y su transporte al lado opuesto de la partícula, donde tendrán lugar las reacciones de óxido-reducción. Este mecanismo tiene una diferencia fundamental con respecto a la electroquímica bipolar clásica. En la BPE clásica la reducción ocurre en la parte polarizada negativa del objeto mientras que con la electroquímica bipolar aplicada simultáneamente con la radiación UV (BPE&UV) la reducción se realiza en la parte polarizada positiva del semiconductor (figura I13).

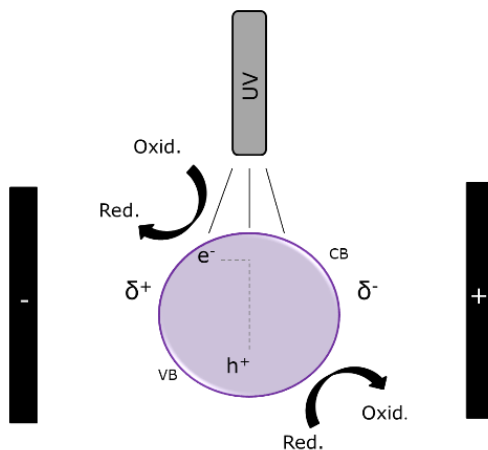


Fig. I13. Mecanismo de oxidación-reducción mediante BPE&UV.

En este trabajo se ha querido aplicar esta metodología a nanopartículas de diamante, en concreto a un tipo de nanopartículas de diamante de un tamaño de entre 3-10 nm y dopadas con boro (DNPsB), para aumentar su conductividad, y a nanohilos de ZnO, de entre 10 y 30 μm sintetizados por el grupo del Profesor José Luis Pau, del Departamento de Física Aplicada de la UAM. El objetivo es conseguir la modificación asimétrica, tanto de las DNPsB como de los nanohilos de ZnO, con un depósito metálico, en concreto oro.

OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO

El objetivo principal de esta tesis es, por un lado, el desarrollo de biosensores electroquímicos y un método óptico para la determinación de glucosa y lactato, con propiedades mejoradas mediante el uso de distintos nanomateriales, en concreto, nanopartículas de diamante (DNPs) y óxido de zinc (ZnO), y, por otro lado, la modificación de dichos nanomateriales de forma asimétrica con el fin de obtener nanoestructuras con dos extremos de diferente reactividad, tipo Janus.

Para alcanzar el objetivo principal de esta tesis se plantean distintos objetivos parciales:

- Caracterizar morfológica y estructuralmente las nanopartículas de diamante empleadas, de 9 nm (DNPs9) y de 4 nm (DNPs4), mediante técnicas como AFM, IR y RAMAN.
- Estudiar la respuesta electroquímica de las DNPs adsorbidas sobre un electrodo de oro frente a un mediador redox en disolución, el hidroximetil ferroceno (HMF).
- Desarrollar biosensores 2D basados en la nanoestructuración de electrodos de oro con las DNPs de distinto tamaño, mediante la inmovilización por adsorción directa tanto de las DNPs como del elemento de reconocimiento, las enzimas glucosa oxidasa (GOx) o lactato oxidasa (LOx).
- Desarrollar un biosensor 3D basado en la integración de las nanopartículas de diamante, en concreto DNPs9, y el elemento de reconocimiento biológico, la LOx, en una red tridimensional de tipo sol-gel usando como precursor el 3-mercaptopropiltrimetoxisilano (MPTS).
- Caracterizar las distintas etapas del desarrollo de los biosensores 2D y 3D mediante espectroscopía Raman, AFM, SEM y voltamperometría cíclica.
- Estudiar su respuesta electrocatalítica frente a glucosa o lactato en presencia de un mediador en disolución, el hidroximetil ferroceno (HMF).

- Poner a punto el funcionamiento de los biosensores y determinar sus propiedades analíticas
- Aplicar los biosensores desarrollados a la determinación de lactato en muestras reales, vino y suero.
- Caracterizar los nanohilos de ZnO mediante microscopía óptica, SEM, espectrofotometría de absorción UV-vis y de fluorescencia.
- Estudiar la interacción de los nanohilos de ZnO con el enzima lactato oxidasa y la formación del bioconjugado nanoestructura -enzima
- Desarrollar un método óptico para la detección de lactato basado en la variación de la fotoluminiscencia del bioconjugado tras la adición de lactato.
- Modificar asimétricamente nanopartículas de diamante dopadas con boro (DNPsB) y nanohilos de ZnO con un depósito metálico, en concreto de oro, empleando la electroquímica bipolar combinada con UV (BPE&UV).
- Caracterización de las nanoestructuras modificadas mediante AFM y SEM.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. REACTIVOS, DISOLUCIONES Y DISPERSIONES

1.1. Reactivos comerciales

Todos los reactivos comerciales que se utilizaron en este trabajo fueron, al menos, de calidad reactivo para análisis. Se utilizaron como se recibieron, sin someterlos a procesos de purificación. Se obtuvieron de las siguientes casas comerciales:

El hidróxido sódico (NaOH), cloruro sódico (NaCl), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), cloruro potásico (KCl), ácido perclórico ($HClO_4$), ferricianuro de potasio ($K_3[Fe(CN)_6]$), ferrocianuro de potasio ($K_4[Fe(CN)_6]$), tetracloroaurato de hidrógeno trihidratado ($HAuCl_4 \times 3H_2O$), cloruro amónico (NH_4Cl), las membranas de Nafion® 117, la agarosa y el Flavín adenín dinucleótido (FAD) han sido suministrados por SIGMA-ALDRICH.

El metanol (MeOH) y el etanol (EtOH) se han obtenido de la casa comercial FLUKA. El ácido sulfúrico (H_2SO_4), fosfato sódico dibásico, fosfato sódico monobásico, acetato de sodio y el ácido clorhídrico (HCl) han sido proporcionados por MERK, el ácido acético por SCHARLAU.

Las nanopartículas de diamante de 9 nm (DNPs9) y de 4 nm (DNPs4) han sido suministradas por SKYSPRING NANOMATERIALS.

Las nanopartículas de diamante dopadas con boro (DNPsB) han sido suministradas por US RESEARCH NANOMATERIALS, Inc.

Las enzimas empleadas fueron: lactato oxidasa (LOx) de *Pediococcus species* liofilizada (EC: 1.13.12.4) que contiene 20 U/mg sólido y glucosa oxidasa (GOx) de *Aspergillus niger* liofilizada (EC 1.1.3.4) que contiene 15200 U/g sólido, ambas suministradas por SIGMA CHEMICAL.

El ácido L-(+)-láctico sal de litio 97%, la D-(+)-Glucosa (99.5%), el 3-mercaptopropil-trimetoxisilano (MPTS), el hidroximetil ferroceno (HMF), el acetaminofén, ácido úrico y ácido ascórbico de ALDRICH CHEMICAL.

El kit enzimático para determinación de lactato (K-LATE 07/14) es de la casa comercial MEGAZYME (Irlanda).

El nitrógeno fue suministrado por CARBUROS METÁLICOS, S.A.

La pasta de diamante 1 μm empleada se obtuvo de la casa comercial BUEHLER.

1.2. Reactivos de síntesis

Óxido de zinc (ZnO): el óxido de zinc fue sintetizado por el grupo de investigación del Profesor José Luis Pau, del Departamento de Física Aplicada de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM), con el que existe una colaboración. Este nanomaterial se sintetizó usando la técnica de Transporte Químico de Vapores (Chemical Vapor Transport (CVT)). Los nanohilos de ZnO son sintetizados en un tubo inerte de cuarzo, colocado de forma horizontal y conectado a una línea de gas. Se coloca, en el fondo del tubo de cuarzo, un crisol que contiene 300 mg de Zn en polvo mientras que en el otro extremo se coloca un sustrato de Si (100). Durante el proceso, se alcanza una temperatura de 900°C bajo un flujo de 100 cm^3 de argón, para evitar la oxidación del Zn en el crisol. Después, se mantiene la temperatura constante durante 120 min y se aplica un flujo de 25 cm^3 de O_2 para llevar a cabo la síntesis de los nanohilos. Finalmente, la temperatura va disminuyendo, manteniéndose un flujo de argón de 100 cm^3 . Los nanohilos de ZnO obtenidos se depositan sobre el sustrato de Si.

1.3. Disoluciones

Ácido sulfúrico 0.1 M: se preparó a partir del ácido sulfúrico comercial (98%) en agua desionizada ultra pura.

Ácido clorhídrico 0.1 M: se preparó a partir del ácido clorhídrico comercial (37%) en agua desionizada ultra pura.

Tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 y pH 4.5: se prepararon a partir de las especies correspondientes del sistema fosfórico-fosfato. El valor del pH se ajustó con una disolución concentrada de NaOH.

Tampón acético/acetato 0.1 M pH 4.5: se preparó a partir de ácido acético glacial y acetato sódico. El pH se ajustó con una disolución concentrada de NaOH.

Hidróxido sódico 0.1 M: se preparó en agua desionizada ultra pura, a partir del sólido comercial.

Ácido perclórico 1 M: se preparó en agua desionizada ultra pura a partir del reactivo comercial.

Hidroximetil ferroceno (HMF) 1.0 mM pH 4.5 y pH 7.0: se preparó una disolución 1.0 mM pesando la cantidad adecuada del reactivo y disolviéndola en tampón acético/acetato 0.1 M pH 4.5 o tampón fosfato 0.1 M pH 7.0, dependiendo de las condiciones óptimas de la enzima con la que se trabajó, GOx o LOx respectivamente.

Ferrocianuro/ferricianuro potásico 10 mM: se preparó disolviendo la cantidad necesaria de ferrocianuro y ferricianuro potásico para una concentración 10 mM en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0, conteniendo cloruro potásico en concentración 0.1 M.

Tetracloroaurato de hidrógeno (HAuCl₄) 2 mM (en mezcla H₂O/EtOH 95:5%V): se preparó pesando la cantidad necesaria de HAuCl₄ y disolviendo en una mezcla de H₂O/EtOH (95:5%V) [Tiewcharoen, 2017].

Cloruro amónico (NH₄Cl) 1 mM en EtOH: se preparó pesando la cantidad adecuada de reactivo comercial y disolviéndolo en EtOH [Tiewcharoen, 2017].

Flavín adenín dinucleótido (FAD) 3mM: se preparó disolviendo la cantidad adecuada de producto comercial en agua desionizada.

Enzimas:

- La disolución stock de glucosa oxidasa (GOx) se preparó disolviendo 7.5 mg de la enzima liofilizada en 250 μL de tampón acético/acetato 0.1 M pH 4.5. Se tomaron alícuotas de 10 μL y se almacenaron a -30°C . En estas condiciones, la actividad enzimática se mantiene estable durante semanas.
- La disolución stock de lactato oxidasa (LOx) se preparó disolviendo 5 mg de enzima liofilizada en 500 μL de tampón fosfato 0.1 M pH 7.0. Se tomaron alícuotas de 10 μL y se almacenaron a -30°C . En estas condiciones, la actividad enzimática se mantiene estable durante semanas.

Sustrato enzimático:

- Lactato 0.01 M: se preparó a partir del sólido comercial (Ácido L-(+)-láctico: sal de litio 97%) en tampón fosfato 0.1 M a pH 7.0, inmediatamente antes de ser utilizada.
- Lactato 2.0×10^{-5} M: se preparó por dilución de una disolución de lactato de concentración 2.0×10^{-4} M, preparada a partir del sólido comercial (Ácido L-(+)-láctico: sal de litio 97%) en tampón fosfato 0.1 M a pH 7.0.
- Glucosa 0.1 M: se preparó a partir del sólido comercial (D-(+)-Glucosa (99.5%)) en tampón acético/acetato 0.1 M pH 4.5, inmediatamente antes de ser utilizada.

1.4. Dispersiones

Dispersión 1 mg mL^{-1} de nanopartículas de diamante (DNPs):

Las dispersiones de las nanopartículas de diamante de 4 y 9 nm se prepararon en agua desionizada ultra pura, pesando el sólido comercial correspondiente (DNPs9 o DNPs4) y sonicando 10 minutos. La dispersión se sonica 30 minutos antes de cada uso.

Dispersión 0.5 mg mL⁻¹ de nanopartículas de diamante dopadas con boro (DNPsB):

La dispersión de DNPsB 0.5 mg mL⁻¹ se preparó a partir del sólido comercial en agua desionizada ultra pura. Se sonicó 30 minutos antes de cada uso.

Dispersiones de ZnO NWs empleadas en electroquímica bipolar-UV (BPE&UV):

Para las medidas realizadas empleando la técnica de BPE&UV se emplearon varias concentraciones diferentes de ZnO NWs.

- Dispersión de ZnO NWs 0.005% (p/v) en EtOH/H₂O (20:1): se preparó pesando la cantidad adecuada de ZnO NWs y dispersándolo en EtOH/H₂O en una relación 20:1, sonicación durante 30 minutos [Ongaro, 2014].
- Dispersión de ZnO NWs 0.01% (p/v) en EtOH/H₂O (20:1): se preparó de la misma manera que en el caso anterior, pesando la cantidad de ZnO NWs adecuada.
- Dispersión de ZnO NWs 0.05% (p/v) en EtOH/H₂O (20:1): se preparó de la misma manera que en el caso anterior, pesando la cantidad de ZnO NWs adecuada.

Dispersión de ZnO NWs para biosensor óptico:

Para el desarrollo del biosensor óptico se preparó una dispersión de ZnO NWs 0.5 mg mL⁻¹ pesando la cantidad adecuada de ZnO NWs y dispersándola en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 sonicando 10 minutos.

1.5. Preparación de sol-gel empleando MPTS como precursor

Se preparó mezclando 200 µL de MPTS con 600 µL de agua, 600 µL de metanol y 200 µL de HCl 0.1 M. Esta disolución se sonicó durante 30 minutos utilizando un baño de ultrasonidos (P-Selecta) a temperatura ambiente. Se añadieron 1.2 mL de metanol y se dejó reposar la mezcla durante tres horas a temperatura ambiente [Parra-Alfambra, 2011].

1.6. Preparación de DNPsB y H_{Au}Cl₄ en gel de agarosa 1.4% (w/v)

Se preparó un gel de agarosa al 1.4% w/v en H₂O, agitando y aplicando calor. Posteriormente se mezcló con H_{Au}Cl₄ y DNPsB obteniendo una concentración final de 2mM y 2.5 µg mL⁻¹, respectivamente. Se agitó aplicando calor durante una hora para homogeneizar.

1.7. Muestras reales

Para la determinación de lactato en muestra real se emplearon dos tipos de vino blanco, de distinta marca comercial, y suero humano, de la casa comercial SIGMA ALDRICH.

Para realizar todas las preparaciones se utilizó agua purificada a través de un sistema de agua ultrapura Direct Q-3 UV de Millipore, que proporciona valores de resistividad de 18.2 MΩ/cm² a 25 °C.

2. MATERIALES

2.1. Electroodos empleados

Para las medidas electroquímicas se emplearon:

- Como electrodo de trabajo, electrodos de oro comercial de BAS (West Lafayette, IN, USA) de área 3.14 mm².
- Como electrodo de referencia un electrodo de Ag/AgCl (Metrohm, 3.0 M KCl).
- Como electrodo auxiliar un hilo de platino de 0.5 mm de diámetro y una pureza del 99.99 % (Goodfellow).

Para las medidas realizadas empleando la técnica electroquímica bipolar simultáneamente con radiación UV (BPE&UV) se emplearon:

- Electrodo de grafito de fabricación propia, empleando mina de lápiz.
- Como electrodo bipolar las DNPsB y los ZnO NWs, para su modificación asimétrica.

2.2. Celdas empleadas

Para realizar las medidas electroquímicas se utilizó una celda de tres bocas con adaptadores de Teflón que permiten cerrar herméticamente la celda y mantener el flujo de nitrógeno para evitar la entrada de oxígeno.

Para llevar a cabo las medidas empleando la técnica BP-UV se usó una celda de fabricación propia (figura 1). Se fabricó una celda formada por un compartimento de reacción con la parte de arriba abierta, para la aplicación de la radiación UV, y dos compartimentos para los electrodos. Los electrodos, ambos iguales, se fabricaron con minas de grafito. El compartimento de reacción se separó de los compartimentos de los electrodos con una lámina de Nafion.

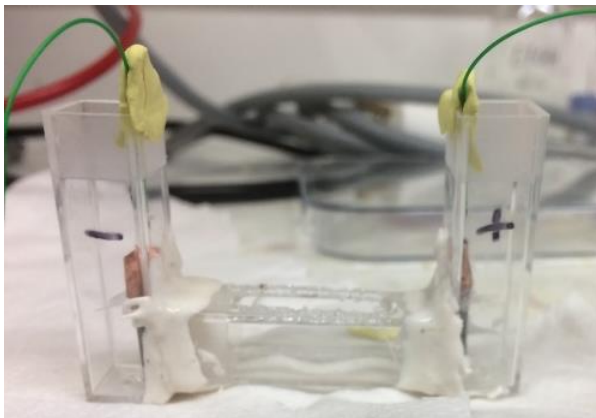


Fig.1: Celda fabricada para la realización de las medidas de BP-UV.

2.3. Soporte para la caracterización mediante microscopía de fuerza atómica (AFM)

Los soportes empleados para las medidas de AFM consisten en placas de vidrio de 1.1 cm × 1.1 cm, recubiertos de una capa de cromo, de 1 a 4 nm de grosor, que mejora la adherencia del oro al sustrato. Sobre esta hay depositada una capa de oro de 200-300 nm de espesor. Las placas fueron proporcionadas por Arrandee Co. (Werther, Alemania). También se usaron placas de silicio, de rugosidad superficial 0.2 nm, para las medidas del tamaño de las nanopartículas de diamante.

La caracterización de las nanopartículas de diamante dopadas con boro (DNPsB) mediante AFM se llevó a cabo sobre mica, previamente exfoliada y lavada con agua desionizada y etanol. Estas medidas se llevaron a cabo durante una estancia realizada en el grupo del Profesor Alexander Kuhn en el Institut des Sciences Moléculaires de la Universidad de Burdeos.

2.4. Soporte para la caracterización mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para la caracterización de las DNPs9 se emplearon las mismas placas de oro que las usadas para la caracterización mediante AFM.

La caracterización del ZnO NWs mediante SEM se llevó a cabo sobre mica, previamente exfoliada y lavada con agua desionizada y etanol. Estas medidas se llevaron a cabo durante la estancia realizada en el grupo del Profesor Alexander Kuhn en el Institut des Sciences Moléculaires de la Universidad de Burdeos.

2.5. Soporte para medidas de espectroscopía Raman

Para la caracterización de las DNPs por espectroscopía Raman se emplearon las mismas placas de oro que se usaron para las medidas de AFM.

3. TÉCNICAS Y EQUIPOS EMPLEADOS

3.1. Técnicas electroquímicas

3.1.1. Voltamperometría cíclica (CV)

Las diferentes técnicas voltamperométricas se distinguen, esencialmente, por la diferente forma de aplicación del potencial. En concreto, la voltamperometría cíclica es una de las técnicas más usadas, especialmente para estudios de procesos redox. Esta técnica se basa en la aplicación de un barrido de potencial sobre el electrodo realizando, lo que se denomina, un barrido triangular de potencial, es decir, se aplica un potencial que varía linealmente con el tiempo entre un potencial inicial (E_i) y un potencial final (E_f), barrido directo, y entre E_f y E_i , barrido inverso, a una velocidad de barrido constante.

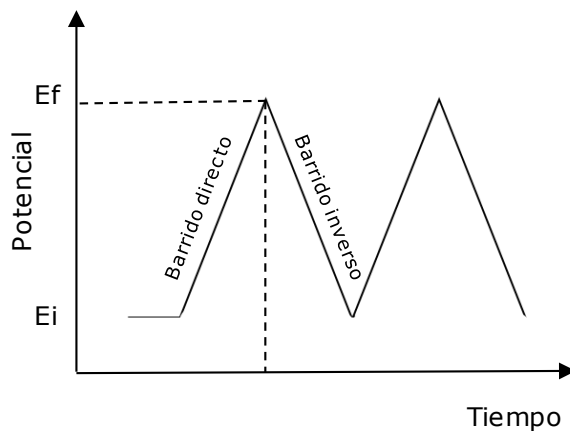


Fig.2. Esquema del programa de potencial en voltamperometría cíclica.

3.1.2. Voltamperometría diferencial de impulsos (DPV)

Otra de las técnicas voltamperométricas es la voltamperometría diferencial de impulsos. En este caso, el potencial aplicado va aumentando en pequeños

incrementos, empleando pulsos de amplitud constante. La corriente se mide antes y después de cada pulso.

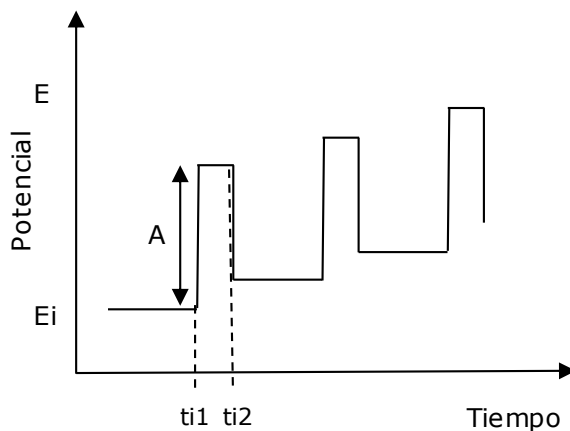


Fig.3. Esquema del programa de potencial en voltamperometría diferencial de pulsos.

3.1.3. Cronoamperometría

La cronoamperometría es una técnica electroanalítica basada en la medida de la corriente debida a la difusión en función del tiempo tras la aplicación de un escalón de potencial. En concreto, la cronoamperometría de pulso sencillo, o de un solo pulso, consiste en la aplicación de un voltaje durante un cierto intervalo de tiempo. Se registra la corriente resultante en dicho intervalo de tiempo.

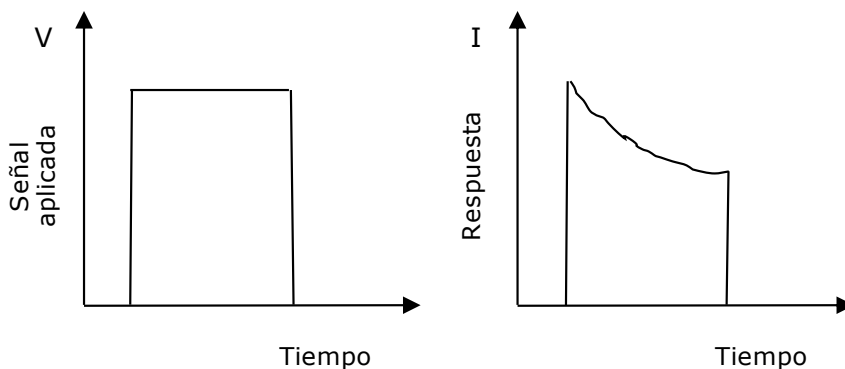


Fig.4. Esquema del programa de potencial en cronoamperometría de un solo pulso.

3.1.4. Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS)

La espectroscopia de impedancia electroquímica es un método electroquímico que tradicionalmente se ha utilizado, sobretodo, en estudios de corrosión. Sin embargo, también ha demostrado ser una técnica eficaz para la caracterización de electrodos modificados [Mirsky, 1997; Lucarelli, 2005]. Con este método se puede estudiar la conductividad de un electrodo modificado mediante el análisis de su respuesta a la aplicación de una señal de excitación que varía con el tiempo de forma periódica a una frecuencia determinada, obteniéndose una respuesta también periódica.

La impedancia es la oposición de un circuito al paso de corriente y se mide en ohmios. Es un concepto más general que el de resistencia, ya que se puede aplicar a circuitos eléctricos con comportamientos más complejos, no está limitada a aquellos que cumplen las propiedades de un resistor ideal. La expresión, análoga a la Ley de Ohm, para calcular la impedancia de un sistema se define como el cociente entre el potencial aplicado y la intensidad medida [Lvovich, 2012]:

$$Z(\omega) = \frac{E(t)}{I(t)} = \frac{E_m \sin(\omega t)}{I_m \sin(\omega t + \Phi)}$$

donde $Z(\omega)$ es la impedancia electroquímica del sistema, ω es la frecuencia y Φ es el desfase entre la corriente medida y el potencial aplicado. Por tanto la impedancia del sistema depende de la frecuencia y consta de una parte real, Z' , y una parte imaginaria, Z'' .

$$Z(\omega) = Z'(\omega) + j Z''(\omega)$$

La interpretación de los resultados obtenidos con este método no es sencilla. Normalmente se suelen representar la parte imaginaria Z'' en función de la parte real Z' , obteniéndose los llamados Diagramas de Nyquist (figura 5). Estos diagramas

se ajustan a la función de impedancia de algunos circuitos equivalentes que además de los parámetros clásicos (resistencias, capacitancias e inductancias) tiene en cuenta otros elementos más complejos [Randles, 1947] entre ellos, la resistencia del electrolito (R_e), la resistencia a la transferencia de carga (R_{CT}), la capacidad de la doble capa correspondiente a la interfase disolución-electrodo de trabajo (C) y la impedancia de Warburg (W).

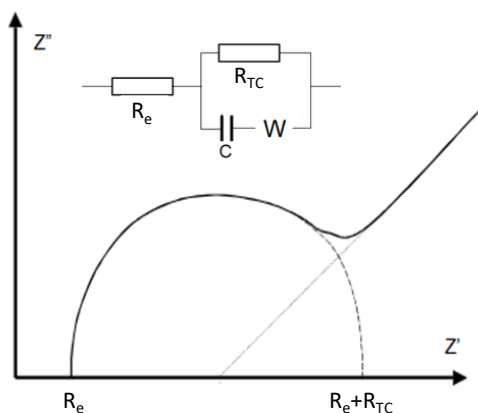


Fig.5. Diagrama de Nyquist correspondiente al circuito equivalente de Randles.

Otra representación habitual son los Diagramas de Bode. Existen distintos tipos de representación, entre ellos los más empleados son la representación del logaritmo decimal del módulo de impedancia frente a logaritmo decimal de los valores de frecuencia aplicados ($\log |Z|$ vs $\log f$) (figura 6 A) y el ángulo de fase frente al logaritmo decimal de la frecuencia (Φ vs $\log f$). (figura 6 B).

En este tipo de diagramas se pueden diferenciar varias regiones de frecuencia. A frecuencia altas el valor de la impedancia nos proporciona el valor de la resistencia del electrolito (R_e). La zona a frecuencias intermedias se corresponde a la suma de la resistencia del electrolito y la de transferencia de carga ($R_e + R_{CT}$). A valores de frecuencia más bajos el módulo de la impedancia corresponde a la resistencia total del circuito ($R_e + R_{CT} + W$).

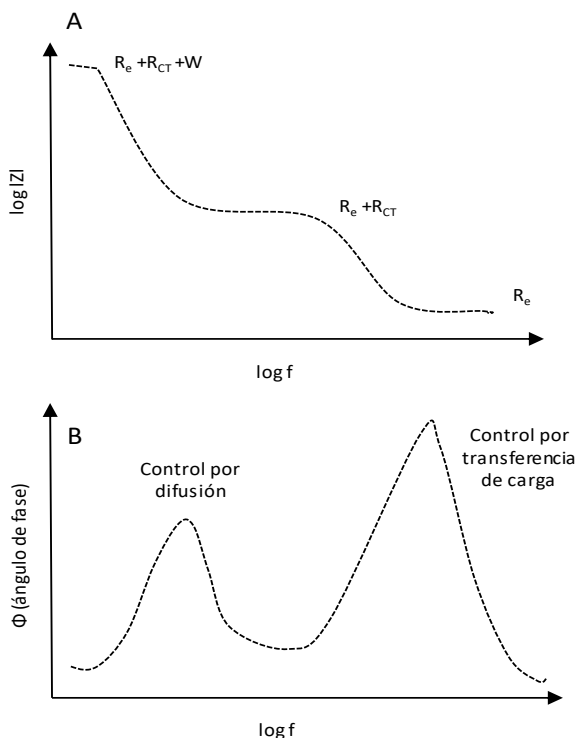


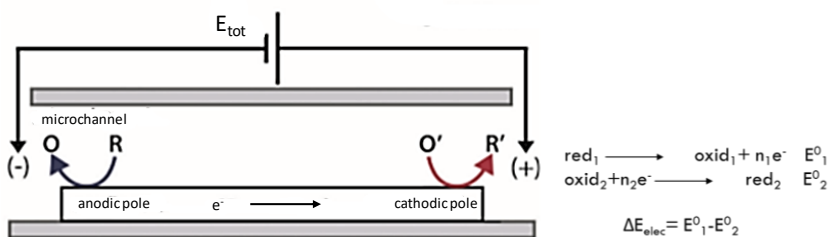
Fig.6. Diagramas de Bode: (A) representación del logaritmo decimal del módulo de impedancia frente a logaritmo decimal de los valores de frecuencia aplicados y (B) representación del ángulo de fase frente al logaritmo decimal de la frecuencia.

Equipos empleados

Las medidas de voltamperometría cíclica, diferencial de impulsos y cronoamperometría se llevaron a cabo utilizando un analizador Ecochemie Autolab PGSTAT12 (Utrecht, The Netherlands). Las medidas de impedancia electroquímica se realizaron con un analizador electroquímico Autolab PGSTAT302N con módulo adicional de Espectroscopia de Impedancia Electroquímica FRA2 de EcoChemie con el software GPES 4.9.

3.1.5. Electroquímica bipolar-UV (BP-UV)

La electroquímica bipolar es una técnica basada en la polarización de un material conductor en un campo eléctrico, que genera una reactividad asimétrica en su superficie (partículas Janus). La diferencia de potencial que se genera entre los dos extremos del material es igual al campo eléctrico aplicado multiplicado por el tamaño del objeto (figura 7).



$$E_{tot} = \Delta E_{elec} \frac{l_{channel}}{l_{elect}}$$

Fig.7. Esquema del funcionamiento de la electroquímica bipolar clásica. Imagen obtenida del artículo [Fosdick, 2013].

Si la diferencia de potencial generada es suficiente, entonces, en presencia de especie redox activas, se pueden dar reacciones redox en los extremos del objeto, es decir, la oxidación ocurrirá en un extremo mientras que en el otro extremo se dará la reducción. Esta técnica tiene como principal limitación el tamaño del objeto conductor, ya que para tamaños muy pequeños la diferencia de potencial necesaria para poder generar esa polarización es muy elevada. Esta técnica, en principio, sólo es válida para objetos conductores, sin embargo, se ha descrito que, combinando la electroquímica bipolar con la aplicación de radiación ultravioleta, de forma simultánea, se puede conseguir la reactividad asimétrica en objetos de pequeño tamaño, del orden de nanómetros, además de poder emplear objetos

semiconductores [Ongaro, 2014]. En este caso, la aplicación de la radiación UV provoca el salto de los electrones a la banda de conducción, generando un par electrón-hueco ($e^- - h^+$), la aplicación de la diferencia de potencial hace que el e^- y el h^+ se desplace cada uno a un extremo del objeto, rompiendo su simetría. En este caso, lo que genera la reacción de oxidación-reducción no es la diferencia de potencial aplicada, sino la radiación, por lo que no hace falta aplicar tanto potencial para obtener la reactividad asimétrica [Tiewcharoen, 2017].

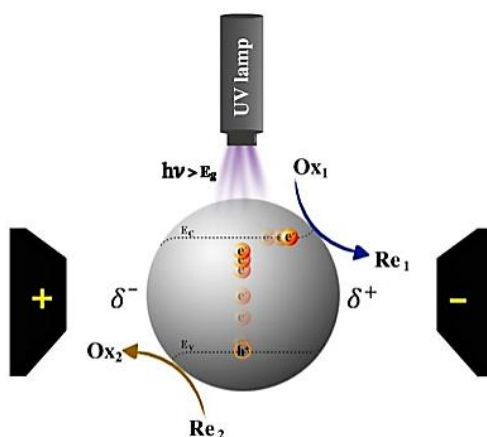


Fig.8. Esquema funcionamiento de la electroquímica bipolar combinada con radiación UV.
Imagen obtenida del artículo [Tiewcharoen, 2017].

Equipos empleados

Las medidas se realizaron en el Institut des Sciences Moléculaires, Burdeos, en el grupo del Profesor Alexander Kuhn. Se empleó una fuente de alto voltaje Heinzing PNC 10000–200 y una lámpara láser Hamamatsu LC8 200 W con lámpara de mercurio-xenon, radiación entre 300 y 450 y al 50% de potencia.

3.2. Técnicas de caracterización superficial

3.2.1. Microscopía de Fuerzas Atómicas (AFM)

La microscopía de campo cercano (Scanning Probe Microscopy (SPM)) consiste en medir la interacción que se produce entre una punta o “sonda” y la superficie a la que se aproxima. Al mover la punta sobre la superficie se obtiene un mapa de la interacción y por tanto una imagen de la muestra a estudiar. Por esto las técnicas de microscopía de campo cercano adquieren un papel muy relevante en la etapa de caracterización, pues permiten visualizar cómo el material biológico y los nanomateriales utilizados se integran con el transductor. Dentro de la microscopía SPM se encuentra la microscopía de fuerzas atómicas (AFM).

Las medidas de AFM se basan en la interacción que se produce entre una punta, unida a una micropalanca flexible llamada “cantilever”, y la superficie de la muestra cuando estas se aproximan (figura 9).

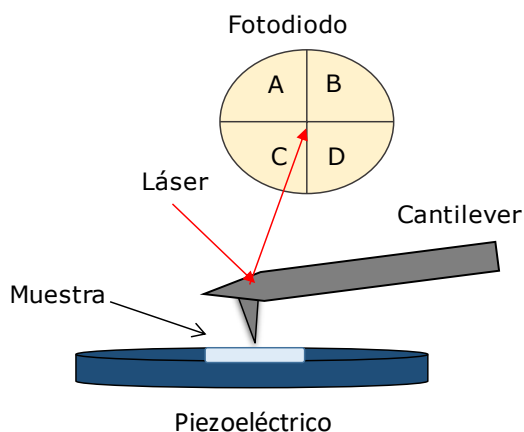


Fig.9. Esquema de funcionamiento de un microscopio de fuerzas atómicas.

La punta se mueve con un sistema de piezoeléctricos, realizando un barrido de la superficie de la muestra. Debido a la interacción que se produce entre la punta y la superficie, el cantiléver sufre una deflexión que depende de la fuerza de dicha

interacción, y que es detectada y medida gracias a un láser. Si se fuerza al sistema a mantener constante la deflexión, es decir, mantener constante la interacción en el eje Z, gracias a un sistema que aplica un voltaje adecuado para ajustar el valor Z del piezo, según se desplaza la punta sobre la muestra en las direcciones XY, ésta mantendrá siempre la misma distancia con respecto a la superficie, por lo que seguirá así el perfil de la topografía superficial, generando una imagen representativa de la superficie con una resolución nanométrica [Putman, 1994; Vaamonde, 2000]. Por tanto, la microscopía de fuerzas atómicas es una técnica muy potente, ya que permite obtener imágenes tridimensionales de la superficie de la muestra, ya sean conductoras o aislantes. Además, permite operar en distintos modos, ofreciendo distintas ventajas según se utilice un modo u otro. Los modos en los que puede operar son:

❖ **Modo contacto:** es aquél en el que la punta barre la muestra en contacto cercano con la superficie. En este caso, se detecta la deflexión del cantiléver respecto a un valor de deflexión fijado. Si la deflexión es diferente a la fijada, se aplica un voltaje al piezo para bajar o subir la muestra hasta alcanzar el valor de deflexión establecido. El voltaje aplicado es una medida de la altura asociada al contorno de la superficie, pues tiene correspondencia directa con la variación que sufre el piezo hacia arriba o hacia abajo. La altura se almacena en función de la posición lateral de la muestra (X, Y) obteniéndose la imagen topográfica de la muestra.

❖ **Modo no contacto:** se emplea cuando el contacto con la punta puede deteriorar o alterar la muestra. En este caso, la punta se sitúa algo más alejada de la muestra, entre 50 y 150 Angstrom, y lo que se detectan son las fuerzas de Van der Waals que se generan entre la punta y la superficie de la muestra.

❖ **Modo de contacto intermitente o “Tapping”:** es el modo más avanzado. Permite obtener una alta resolución en las imágenes topográficas en los casos en

los que la muestra puede dañarse con facilidad. En el modo tapping, se utiliza la oscilación del cantilever en su frecuencia de resonancia o cercana a ella utilizando un cristal piezoeléctrico. El cantilever oscila con una amplitud elevada cuando la punta no está en contacto con la superficie. Al aproximarse la punta a la superficie de la muestra, esta oscila verticalmente mientras barre la muestra. En este proceso, la oscilación del cantilever se ve reducida debido a la pérdida de energía causada por el propio contacto. Esta reducción de la oscilación es la magnitud usada para identificar y medir las características superficiales de la muestra.

La principal limitación a la resolución del AFM viene dada por la geometría de la sonda y de la muestra. En este sentido muchos autores indican que es el radio de curvatura de la punta lo que influye en gran medida en la capacidad de resolución del AFM, es lo que se llama efectos de convolución de la punta [Shen, 2017].

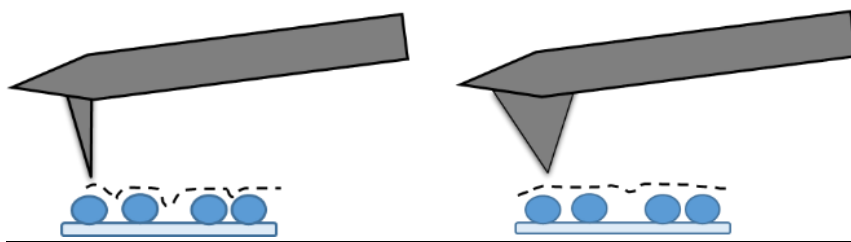


Fig.10. Efecto de la geometría de la punta en la resolución del AFM.

Curvas de Fuerza

Estos experimentos se realizan fijando la sonda en un punto concreto de la muestra. La sonda se aproxima a la superficie de la muestra y posteriormente se aleja debido a la aplicación de una rampa de voltaje al z-piezo. Se obtienen gráficas de la deflexión de la punta con respecto a la posición vertical del z-piezo. Para el caso de muestras duras, estas curvas de fuerza presentan dos regímenes: el primero se corresponde a cuando la sonda está lejos de la muestra, donde la deflexión es nula

ya que no existen interacciones entre sonda y muestra, y el segundo cuando la sonda entra en contacto con la superficie de la muestra, obteniéndose una región con una marcada pendiente. Para el caso de muestras blandas, la punta puede penetrar en la superficie por lo que se obtienen regiones curvas o rectas con pendientes menores que en el caso de una muestra dura.

Equipos empleados

Las imágenes de AFM de las DNPs se obtuvieron con un equipo Nanoscope IIIa (Veeco). Para los estudios realizados al aire, se utilizaron puntas de silicio, con una constante de fuerza nominal en un rango de 1-5 N/m y un radio nominal de punta de 8 nm (Bruker). Para las medidas realizadas en tampón (disolución tampón fosfato 0.1 M pH 7.0) se usaron puntas de nitruro de silicio, con una constante de fuerza nominal de 0.24 N/m y un radio nominal de punta de 10 nm. Todas las imágenes se tomaron en modo contacto intermitente o “tapping”.

Las medidas de curvas de fuerza se llevaron a cabo en tampón. Se representaron las deflexiones obtenidas frente a la separación real de la punta respecto de la superficie. Los resultados de deflexión se normalizaron teniendo en cuenta que el valor de la pendiente en la zona de no interacción tiene que ser igual a cero. De esta manera, la situación en la que se encuentra una superficie dura o rígida es fácilmente identificada por la aparición de rectas verticales.

Las medidas de AFM de las DNPsB se realizaron en el Institut des Sciences Moléculaires, Burdeos, empleando un equipo Veeco Multimode 8 Scan, en modo contacto.

3.2.2. Microscopía de fuerza Kelvin (KFM)

La microscopía de fuerza Kelvin, también conocida como microscopía de potencial de superficie, es una variante de no contacto de la microscopía de fuerza atómica. Permite obtener imágenes de las propiedades electrónicas superficiales, es decir,

un mapa espacial del potencial superficial, junto con la imagen de la morfología [Melitz, 2011]. Además, también puede obtenerse el gradiente de capacitancia, dC/dZ , el cual depende de la constante dieléctrica y del espesor local de la muestra [Cadena, 2013].

Equipos empleados

Las medidas de KFM se realizaron sobre la superficie de oro modificada con MPTS y DNPs9. Estas medias se tomaron bajo condiciones ambientales con un equipo Agilent 5500 Picoplus, empleando puntas de sílice con nanopartículas de oro de entre 2-3 nm (de NEXT TIP, España).

3.2.3. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido es una técnica que permite obtener información de la morfología y composición de la superficie de una muestra a escala nanométrica. Se basa en el bombardeo de la muestra por un haz de electrones. Este bombardeo de electrones primarios provoca la emisión de electrones de distinta naturaleza:

- Electrones secundarios, que proporcionan información topográfica.
- Electrones retrodispersados, que proporcionan el análisis químico de las muestras.

Equipos empleados

El microscopio electrónico de barrido empleado para las DNPs fue un ISI (DS-130C). Las medidas de SEM de los ZnO NWs se realizaron en el Institut des Sciences Moléculaires, Burdeos, empleando un equipo Hitachi TM-1000. Ambas medidas se realizaron en condiciones de alto vacío.

3.3. Técnicas espectroscópicas

3.3.1. Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopía de infrarrojo es un método extremadamente fiable y reconocido para la caracterización, identificación e incluso cuantificación de sustancias. Una de sus ventajas es su capacidad como técnica analítica para obtener el espectro de gran variedad de sólidos, líquidos y gases.

Esta espectroscopía se basa en la adsorción de la radiación infrarroja por las moléculas en vibración. Los enlaces químicos de las sustancias tienen frecuencias de vibración específicas, que corresponden a los niveles de energía de la molécula. Existen dos modos principales de vibración, tensión y flexión, y éstos están cuantizados. La absorción de luz infrarroja de energía o frecuencia apropiada excita las moléculas desde su estado fundamental a su estado excitado produciendo uno de los dos tipos de vibración. La frecuencia o longitud de onda de cada modo de absorción es función de la masa relativa de los átomos, de la constante de fuerza de los enlaces y de la geometría de la vibración, por lo que se pueden asignar frecuencias características, de tensión o flexión, a los grupos funcionales específicos. El movimiento de flexión o tensión debe ir acompañado de un cambio en el momento dipolar, por tanto, cuanto más polar sea un enlace, más intenso será el pico correspondiente a su frecuencia de vibración en el espectro.

Equipos empleados

En este trabajo, las medidas de FT-IR se llevaron a cabo utilizando un espectrómetro Bruker IFS66v. Todos los espectros se obtuvieron desde 7000 a 550 cm^{-1} usando una resolución de 4 cm^{-1} . Se recogieron 250 barridos para cada espectro y se restó el blanco en todos los casos. Las medidas de FT-IR se llevaron a cabo en pellet de KBr.

3.3.2. Espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman es una técnica espectroscópica de alta resolución basada en la dispersión inelástica de una luz monocromática, normalmente un láser, que proporciona información química y estructural de casi cualquier material, orgánico o inorgánico, permitiendo su identificación. Al hacer incidir un haz de luz monocromática de frecuencia ν_0 sobre una muestra, parte de esta radiación es dispersada. La mayor parte de esta luz dispersada mantendrá la misma frecuencia ν_0 que la incidente, es lo que se conoce como dispersión Rayleigh, y no aporta información estructural de la muestra. En cambio, otra parte de la luz dispersada presenta frecuencias distintas a las de la luz incidente, dispersión Raman. Estas nuevas frecuencias son características de la naturaleza química y el estado físico de la muestra e independientes de la radiación incidente, por tanto, son las que aportan información de la composición molecular de la muestra.

Cuando un fotón de frecuencia ν_0 es absorbido por una molécula activa en Raman que se encuentra en su estado vibracional básico, parte de la energía de ese fotón se transfiere a la molécula con una frecuencia ν_m y la frecuencia resultante es dispersada con frecuencia $\nu_0 - \nu_m$. Es lo que se llama frecuencia Stokes. Si la molécula que absorbe el fotón se encuentra en un estado vibracional excitado, la molécula volverá a su estado vibracional básico y la frecuencia resultante será dispersada con frecuencia $\nu_0 + \nu_m$. Es lo que se conoce como frecuencia Anti-Stokes.

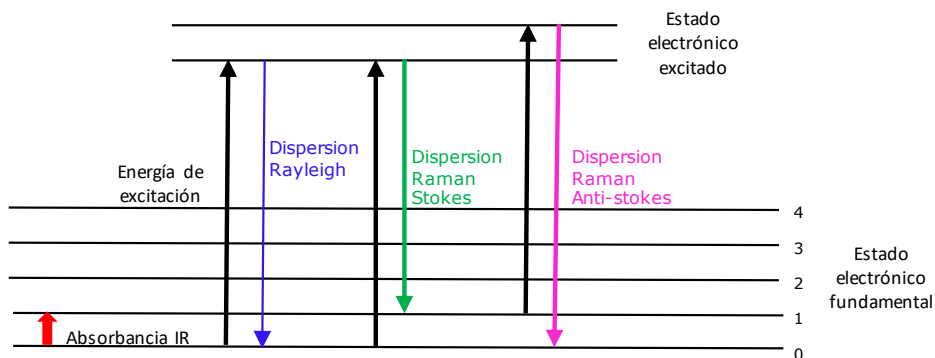


Fig.11. Transiciones entre estados energéticos para diferentes interacciones luz-materia.

Equipos empleados

Las medidas de espectroscopía Raman se llevaron a cabo empleando un microscopio Raman confocal Bruker Senterra (Bruker Optic, Ettlingen, Germany, resolución $3\text{--}5\text{ cm}^{-1}$). Las medidas se realizaron usando un láser de excitación de 532 nm, a 10 mW, 5 acumulaciones y un tiempo de integración de 0.5 s.

3.3.3. Espectroscopía de fluorescencia

La espectroscopia de fluorescencia se basa en la capacidad que tienen algunas sustancias de absorber luz a una determinada longitud de onda, normalmente en el intervalo de la luz ultravioleta (UV) y emitir luz a una longitud de onda mayor, es decir, emiten fotones de menor energía. La absorción de un fotón de luz provoca la excitación de los electrones de la molécula desde su estado basal a uno de los estados vibracionales del estado electrónico excitado. Debido a las colisiones con otras moléculas, la molécula en estado excitado pierde energía vibracional hasta que alcanza el estado vibracional más bajo del estado electrónico excitado. Posteriormente la molécula desciende a uno de los distintos niveles de vibración del estado electrónico basal, emitiendo un fotón. Este proceso es casi inmediato, por lo que la fluorescencia dura tanto como el estímulo.

Equipos empleados

Las medidas se realizaron empleando un fluorímetro marca Varian Cary Eclipse. Las medidas se realizaron a una longitud de onda de excitación de 330 nm.

3.4. Caracterización mediante potencial Zeta (ζ)

El potencial Zeta es un parámetro físico que permite obtener una medida de la carga superficial de las partículas. Está relacionada con la estabilidad de una dispersión, y depende de los grupos funcionales presentes en la superficie de las partículas y del pH de la solución. Si el valor absoluto del potencial Zeta es superior a 25-30 mV se considera que es una dispersión estable [Müller, 2001].

Equipos empleados

Las medidas de potencial Zeta se llevaron a cabo a 25 °C utilizando un instrumento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument Ltd., Grovewood, Worcestershire, Reino Unido).

3.5. Otros equipos empleados

Se empleó una balanza AD-4 Perkin-Elmer, una microbalanza MX5 Mettler Toledo, un baño de ultrasonidos (P-Selecta), una fuente de alto voltaje DC Heinzinger PNC 10000-200POS, y una lámpara de mercurio-xenón LC8 de HAMAMATSU 200W, que radia entre 300 y 450 nm, radiación UV.

4. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

4.1. Pretratamiento de los electrodos de oro

Antes de su modificación, los electrodos de oro se sometieron, primero, a un proceso de pulido y, posteriormente, a un proceso de activación por vía electroquímica. El pulido de los electrodos se llevó a cabo utilizando pasta de diamante de 1 μm (Buehler). Una vez pulidos de forma adecuada, los electrodos se aclararon con abundante agua, y se sonicaron durante 10 minutos en agua destilada para eliminar los posibles restos del proceso de pulido.

4.2. Activación de los electrodos de oro

Tras el proceso de pulido, los electrodos de oro se activaron aplicando un potencial de +2.0 V durante 5 s en H_2SO_4 0.1 M y de -0.35 V durante 10 s, seguido de un potencial cíclico de -0.20 V a +1.5 V, a una velocidad de barrido de 5 V s^{-1} durante 2 minutos. Tras este tratamiento, se registró el voltamperograma cíclico característico de los electrodos de oro policristalinos (desde -0.20 V a +1.5 V) a 100 mV s^{-1} .

4.3. Desarrollo del biosensor Enzima/DNPs/Au

4.3.1. Modificación de electrodos con nanopartículas de diamante (DNPs/Au)

La superficie del electrodo activado se modificó, para ambos tamaños de nanopartículas de diamante (9 y 4 nm), depositando sobre ella 5 μL de una dispersión de DNPs de concentración 1 mg mL^{-1} en agua destilada, previamente sonicada 30 minutos. Se dejó secar al aire.

4.3.2. Modificación del electrodo DNPs/Au con la enzima (Enzima/DNPs/Au)

Tras la modificación de los electrodos de oro con las DNPs, el siguiente paso para el desarrollo del biosensor consistió en la inmovilización, por adsorción directa, de la enzima correspondiente, GOx o LOx, sobre el electrodo. Para ello, se depositó 5 μL de la disolución stock de la enzima correspondiente. Tras dejar secar al aire, los electrodos modificados se aclararon con agua.

4.3.3. Modificación de electrodos con glucosa o lactato oxidasa (GOx/Au o LOx/Au)

Se modificó la superficie de un electrodo de oro, previamente activado, con 5 μL de la disolución stock de la enzima GOx o LOx, se dejó secar al aire y posteriormente se aclaró con agua.

4.4. **Desarrollo del biosensor Enzima/DNPs9/MPTS/Au**

4.4.1. Modificación de electrodos con MPTS (MPTS/Au)

El primer paso para el desarrollo del biosensor consistió en la modificación del electrodo de oro, previamente activado, con MPTS mediante la inmersión en una disolución sol-gel MPTS durante una hora. El sol-gel MPTS se queda quimisorbido sobre el electrodo de oro y permite la formación de la red tridimensional de silicato [Jena, 2006]. El sistema MPTS/Au resultante se lavó con agua.

4.4.2. Modificación del electrodo MPTS/Au con DNPs9 (DNPs9/MPTS/Au)

Posteriormente, el electrodo MPTS/Au se modificó depositando 5 μL de una dispersión de nanopartículas de diamante de un tamaño de 9 nm (DNPs9) en agua (1 mg mL^{-1}) y se dejó secar al aire. Después, el sistema DNPs9/MPTS/Au se aclaró con agua.

4.4.3. Modificación de DNPs9/MPTS/Au con la enzima (Enzima/DNPs9/MPTS/Au)

El último paso del desarrollo del biosensor se llevó a cabo depositando 5 μL de la enzima correspondiente (GOx o LOx) sobre la superficie del electrodo (Enzima/DNPs9/MPTS/Au) y dejando secar al aire.

4.5. Caracterización morfológica

4.5.1. Caracterización del sistema Enzima/DNPs9/Au mediante SEM

Las superficies usadas para estas medidas consistieron en sustratos de vidrio de 1 cm x 1 cm recubiertas con una capa de cromo (1-4 nm) sobre la que hay depositada una capa de oro de entre 200-300 nm. Antes de su utilización, las superficies de oro se sometieron a un tratamiento con llama durante 2 minutos con el objetivo de obtener terrazas de oro (111). Las muestras se prepararon depositando 100 μL de una suspensión de DNPs9 en agua (1 mg mL⁻¹) sobre la superficie de oro y dejándola secar al aire. Posteriormente se modificó con 100 μL del stock de enzima y se dejó secar al aire. Se realizó la caracterización de cada etapa de la modificación.

4.5.2. Caracterización de los ZnO NWs mediante SEM

La caracterización de los ZnO NWs mediante SEM se llevó a cabo empleando como soporte mica previamente exfoliada y lavada con agua y etanol. La superficie de mica se modificó por inmersión en una dispersión 1mg mL⁻¹ de ZnO NWs, sonicada previamente 30 minutos.

4.5.3. Caracterización del sistema Enzima/DNPs/Au mediante AFM

Las muestras para la caracterización morfológica por AFM se prepararon empleando los mismos sustratos y siguiendo el mismo procedimiento que para la caracterización por SEM.

4.5.4. Caracterización del sistema LOx/DNPs9/MPTS/Au mediante AFM

Las muestras para la caracterización del sistema Enzima/DNPs9/MPTS/Au mediante AFM, se prepararon por inmersión del soporte para AFM, previamente tratado con llama, en una disolución sol-gel MPTS durante una hora. El electrodo MPTS/Au se aclaró con agua y sobre ella se depositaron 100 μL de una dispersión de DNPs9 1 mg mL^{-1} en agua, dejándose secar al aire. Se aclaró con agua y, finalmente, se modificó depositando 100 μL de la enzima LOx, dejando secar al aire. Se caracterizó cada una de las etapas de modificación.

4.5.5. Caracterización de las DNPsB mediante AFM

Para la caracterización de las DNPsB mediante AFM, se empleó como soporte mica previamente exfoliada y lavada con agua y etanol. La superficie de mica se modificó por inmersión en una suspensión de DNPsB 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en etanol, previamente sonicada durante 30 minutos.

4.6. **Determinación del tamaño de las DNPs mediante AFM**

Las muestras para determinar el diámetro medio de las nanopartículas de diamante mediante AFM se prepararon de forma diferente debido a la gran tendencia de las nanopartículas a agregarse [Kulakova, 2004]. En este caso, es necesario modificar una superficie plana con nanopartículas aisladas para poder medir la altura de manera inequívoca. Primero, se usaron los mismos soportes de oro que para el resto de medidas de AFM, pero se comprobó que no eran adecuadas para este estudio debido a la rugosidad. Por tanto, se utilizó un sustrato diferente, el silicio ya que su rugosidad superficial es de sólo 0.2 nm. Los sustratos de silicio se colocaron en el fondo de un vaso que contenía una suspensión de DNPs en agua (1 mg mL^{-1}), y se sonicó durante una hora. De esta manera, gracias al proceso de agitación, se favorece la disgregación de los aglomerados [Krüger, 2005].

Posteriormente, la superficie modificada de este modo se secó con nitrógeno y se midió por AFM en modo contacto intermitente. Para evitar los efectos de convolución de la punta, la distribución de tamaños se realizó midiendo las alturas de las DNPs aisladas.

4.7. Caracterización de la superficie Enzima/DNPs/Au mediante espectroscopía Raman

Para las medidas Raman, las placas de oro se activaron y modificaron siguiendo el mismo protocolo empleado para la modificación de electrodos.

Se modificó también una placa de oro, previamente activada de la misma manera, con FAD 3 mM.

4.8. Caracterización de la superficie MPTS/Au mediante espectroscopía de infrarrojo

Para la caracterización de la superficie MPTS/Au mediante IR, en primer lugar, se preparó el sol-gel, siguiendo el protocolo anteriormente descrito en el apartado 1.5. Tras dejar las tres horas de reposo, se introdujo una placa de oro, previamente lavada con agua destilada, durante 1 hora. Finalmente, se lavó por inmersión en H₂O.

4.9. Medidas electroquímicas

Las medidas electroquímicas, voltamperometría cíclica, voltamperometría diferencial de impulsos y cronoamperometría, se llevaron a cabo utilizando un mediador, el hidroximetil ferroceno (HMF), en disolución, empleando una celda electroquímica de tres bocas con adaptadores PTFE, que permiten cerrar herméticamente la celda y mantener el flujo de nitrógeno para evitar la entrada de

oxígeno. Previamente a los experimentos, se procedió a la desoxigenación de la disolución mediante el flujo de N_2 durante veinte minutos. Las medidas se realizan en reposo, por tanto, en el momento de la medida se mantiene el N_2 dentro de la celda, pero alejado de la disolución, evitando así la convección.

Para las medidas de espectroscopia de impedancia electroquímica se empleó una disolución $K_3Fe(CN)_6 / K_4Fe(CN)_6$ 10 mM en tampón fosfato pH 7.0, conteniendo KCl 0.1 M. Se aplicó una onda sinusoidal de potencial ± 10 mV de amplitud en un intervalo de frecuencias entre 10^4 - 10^{-2} Hz, para los electrodos MPTS/Au, DNPs9/MPTS/Au y el biosensor LOx/DNPs9/MPTS/Au, y 10^4 -1 Hz para el electrodo de oro sin modificar, Au, respecto al potencial de equilibrio del par redox $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$. Los valores de R_{CT} se calcularon mediante el ajuste de los resultados experimentales a un circuito equivalente utilizando el software GPES 4.9.

4.10. Determinación de lactato en muestra real

Determinación de lactato en muestra de vino blanco

Para la determinación de lactato en las muestras de vino se empleó el método de adición estándar. Se prepararon varios matraces de 10 mL, conteniendo 2 mL de vino (previamente diluido) en cada uno, al que se adicionaron volúmenes crecientes (0, 100, 200, 300, 400 y 500 μ L) de una disolución patrón de ácido láctico 0.010 M y se enrasaron con tampón fosfato 0.1 M pH 7.0, conteniendo HMF en una concentración final de 1.0 mM. La concentración de lactato obtenida utilizando los biosensores desarrollados se comparó con los obtenidos por un kit enzimático comercial.

Determinación de lactato en muestra de suero

Para la determinación de lactato en la muestra de suero humano, en primer lugar, se desproteinizó el suero, siguiendo las instrucciones del fabricante del kit usado como control, con el fin de que las medidas fueran comparables. La

desproteínización consistió en mezclar, a partes iguales, suero y ácido perclórico 1 M frío. Se agitó y se centrifugó durante 10 minutos. Se recogió el sobrenadante. Una vez desproteínizado, se neutralizó con NaOH 1 M. Igual que en el caso del vino, se empleó el método de adición estándar para la determinación de lactato.

En este caso, se prepararon varios tubos de 5 mL, conteniendo 0.5 mL de suero en cada uno, al que se adicionaron volúmenes crecientes (0, 100, 200, 300, 400 y 500 μ L) de la disolución patrón de ácido láctico 0.010 M y se enrasaron con tampón fosfato 0.1 M pH 7.0, conteniendo HMF en una concentración final de 1.0 mM. Los resultados obtenidos se compararon con los obtenidos por el kit enzimático comercial.

4.11. Determinación de lactato mediante el kit enzimático

Como se ha mencionado en el apartado anterior, los resultados de la concentración de lactato en las muestras reales obtenidos usando los electrodos desarrollados se compararon con los resultados obtenidos utilizando un kit comercial. Este kit enzimático está basado en la enzima lactato deshidrogenasa y la D-glutamato-piruvato transaminasa (D-GTP). Siguiendo las instrucciones del fabricante, a la muestra diluida, en el caso del vino y, desproteínizada y diluida, en el caso del suero humano, se le añadieron el NAD⁺ y la enzima D-GTP. Tras 3 minutos de reposo, se midió el valor de la absorbancia a 340 nm. Posteriormente se añadió la enzima lactato deshidrogenasa (L-LDH) y, pasados 10 minutos, se midió de nuevo la absorbancia.

El NADH formado se midió por el aumento en la absorbancia a 340 nm y se correlacionó con la concentración de ácido L-láctico empleando la siguiente ecuación, siguiendo las instrucciones del fabricante:

$$C = \frac{V \cdot MW}{\epsilon \cdot d \cdot v} \Delta A_{\text{Ácido L-láctico}}$$

donde V es el volumen final, MW la masa molecular del ácido láctico (90.1 g mol^{-1}), ϵ es el coeficiente de extinción molar del NADH a 340 nm ($6300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), d el paso óptico de la celda espectrofotométrica (1 cm) y v el volumen de la muestra.

4.12. Electroquímica bipolar aplicada a partículas de carbono

Se inmovilizaron varias partículas de carbono, de un diámetro de 1 mm, sobre cinta adhesiva y se colocaron en el compartimento de reacción de la celda fabricada para estos experimentos. Se cubrieron con 2 mL de una disolución de $\text{HAuCl}_4 \times 3 \text{ H}_2\text{O}$ 2 mM en $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ (95:5%V) [Tiewcharoen, 2017] y en cada uno de los compartimentos de los electrodos se puso 1 mL de disolución NH_4Cl 1 mM.

4.13. Electroquímica bipolar combinada con radiación UV (BPE&UV)

Empleando DNPsB como electrodo bipolar: 10 μL de la dispersión de DNPsB 0.5 mg mL^{-1} en H_2O y se llevaron a 2 mL con HAuCl_4 2 mM, sonicando durante 1 hora, obteniéndose una concentración final de DNPsB en la celda de $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Los 2 mL de esta dispersión se introdujeron en el compartimento de reacción de la celda fabricada para estos experimentos mientras que en los compartimentos de los electrodos se pone 1 mL de la disolución de NH_4Cl 1 mM [Tiewcharoen, 2017].

Empleando ZnO NWs como electrodo bipolar: se pesó la cantidad necesaria de HAuCl_4 y se disolvió en la dispersión adecuada de ZnO NWs (0.005%, 0.05% o 0.01% en $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ 20:1), de forma que la concentración final de HAuCl_4 fuera de 1 mM. Al igual que para el caso de las DNPsB, esta dispersión se puso en el compartimento de reacción de la celda fabricada para estos experimentos mientras

que, en los compartimentos de los electrodos, se pone 1 mL de la disolución de NH_4Cl 1 mM [Ongaro, 2014].

4.14. Preparación del bioconjugado ZnO NWs-LOx para la determinación de lactato

Se preparó una dispersión conteniendo 0.5 mg mL^{-1} de ZnO NWs en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0, sonicando durante 10 minutos. Se adicionó un volumen del stock de la enzima LOx de manera que la concentración final de esta en la mezcla es de 0.5 mg mL^{-1} . La mezcla se mantuvo en incubación durante 2 horas con agitación suave y, posteriormente, se centrifugó durante 10 minutos a 7000 r.p.m. con el objeto de eliminar el exceso de LOx. Por último, el bioconjugado ZnO NWs-LOx se resuspendió en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 [Sodzel, 2015].

4.15. Medidas de lactato mediante bioensayo óptico basado en ZnO NWs

Se obtuvo el espectro de emisión del bioconjugado ZnO NWs-LOx, preparado siguiendo el procedimiento anteriormente descrito, con distintas concentraciones de lactato, empleando una longitud de onda de excitación de 330 nm. A modo de control, se llevó a cabo el mismo procedimiento de medida para los ZnO NWs, previamente sometido al mismo proceso que se realiza para la formación del bioconjugado.

5. CÁLCULO DE PARÁMETROS Y CONSTANTES DE INTERÉS

5.1. Cálculo de la constante catalítica mediante el método de Galus

La constante catalítica de los procesos con electrodos modificados se calculó según el método Galus [Galus, 1991], empleando cronoamperometría de un solo pulso en

función de la concentración de sustrato. Este método se basa en la siguiente ecuación:

$$I_{\text{cat}}/I_{\text{dif}} = \gamma^{1/2} [\pi^{1/2} \text{erf}(\gamma^{1/2}) + \exp(-\gamma) / \gamma^{1/2}] \quad (\text{Ec. 1})$$

La relación $I_{\text{cat}}/I_{\text{dif}}$, es la eficiencia catalítica del electrodo modificado, respuesta del electrodo en presencia (I_{cat}) y en ausencia (I_{dif}) de la sustancia electrocatalizada, γ es el argumento de la función de error (erf), y viene dada como $\gamma = kC^*t$, donde C^* es la concentración de la sustancia electrocatalizada, en mol L^{-1} , en el seno de la disolución, t el tiempo de muestreo, en s, y k es la constante catalítica, en $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$. Cuando γ es superior a 2, la función de error se iguala a 1 y la ecuación anterior queda simplificada a:

$$I_{\text{cat}}/I_{\text{dif}} = \pi^{1/2} \gamma^{1/2} = \pi^{1/2} (kC^*t)^{1/2} \quad (\text{Ec.2})$$

Representando $I_{\text{cat}}/I_{\text{dif}}$ respecto a $t^{1/2}$ para las distintas concentraciones de la especie electroactiva se obtienen diferentes rectas. Al representar las pendientes de estas rectas frente a $C^{1/2}$ se obtiene otra recta, de cuya pendiente podemos estimar la constante catalítica (k), expresada en $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, de acuerdo con la ecuación 2.

5.2. Deconvolución de bandas de los espectros Raman

Para hacer la deconvolución de las bandas de los espectros Raman se utilizó el programa Microsoft Excel con el complemento Solver. La banda D se ajustó a una función Lorentziana, ecuación 3, donde la μ es el centro de la curva y σ es la anchura de la banda.

$$L(x) = \frac{1}{\pi} \frac{\sigma}{(x-\mu)^2 + (\sigma)^2} \quad (\text{Ec.3})$$

Sin embargo, la banda G se ajustó a una función Breit-Wigner-Fano (BWF), ecuación 4, donde μ es el centro de la curva, σ es la anchura de la banda y q es el parámetro de Fano [Ferrari, 2000].

$$BWF(x) = \frac{A \left(\frac{q\sigma}{2} + x - \mu \right)^2}{\left(\frac{\sigma}{2} \right)^2 + (x - \mu)^2} \quad (\text{Ec.4})$$

5.3. Cálculo de la constante cinética de la reacción enzimática (K_M)

La velocidad de una reacción enzimática depende de la concentración de la enzima. Cuando el sustrato está en exceso existe una relación entre dicha velocidad y la concentración de la enzima. A concentraciones bajas de sustrato, la velocidad de la reacción es proporcional a la concentración de sustrato, se establece un sistema de primer orden. A medida que aumenta la concentración, la velocidad va variando su dependencia con ella, hasta llegar a un sistema de orden cero, donde la velocidad es independiente de la concentración de sustrato, la enzima alcanza su estado de saturación. Si la reacción enzimática involucra un solo sustrato, esta puede ser formulada como:



Partiendo de este mecanismo y para una concentración de enzima fija, la velocidad de la reacción catalizada enzimáticamente viene dada por la ecuación de Michaelis-Menten (ecuación 5) [Johnson, 2011]:

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{(K_M + [S])} \quad (\text{Ec.5})$$

V_{\max} es la velocidad máxima de la reacción y K_M es la constante de Michaelis-Menten, que corresponde a la concentración de sustrato para la cual la velocidad

es igual a la mitad de la velocidad máxima. Reagrupando matemáticamente se obtiene la ecuación de Lineweaver-Burk (ecuación 6):

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{\max}[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (\text{Ec.6})$$

Al representar $1/V$ en función de $1/[S]$ se obtiene una recta cuya pendiente y ordenada son K_M/V_{\max} y $1/v_{\max}$ respectivamente [Baduí, 1999].

Cuanto más alta es la constante de Michaelis-Menten menor es la sensibilidad del método, pero mayor el intervalo de linealidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 1

BIOSENSORES BASADOS EN ELECTRODOS DE ORO NANOESTRUCTURADOS CON NANOPARTÍCULAS DE DIAMANTE (DNPs)

1.1

CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE DIAMANTE (DNPs) EMPLEADAS EN LA NANOESTRUCTURACIÓN DE ELECTRODOS DE ORO

1.1.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS DNPs

1.1.1.1. Caracterización morfológica de las DNPs mediante SEM

El primer paso que se llevó a cabo para alcanzar los objetivos planteados en esta tesis fue la caracterización morfológica de las nanopartículas de diamante empleadas en la nanoestructuración de los electrodos de oro. Aunque las DNPs no tiene un carácter conductor, en primer lugar, se obtuvo la imagen SEM de una placa de oro sin modificar y modificada con DNPs9, siguiendo el proceso descrito en el apartado 4.5.1. de materiales y métodos. Como se puede ver en la figura 1.1.1, las imágenes presentan claras diferencias, pudiéndose observar en la figura 1.1.1 B unas estructuras correspondientes a las DNPs9.

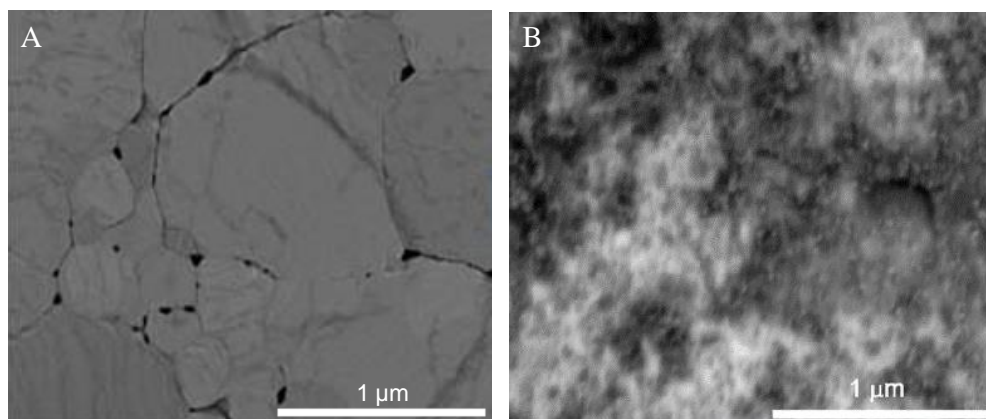


Fig. 1.1.1. Imagen FE-SEM de una superficie de oro sin modificar (A) y modificada con DNPs9 (B).

1.1.1.2. Caracterización morfológica de las DNPs mediante AFM. Determinación del tamaño

Para poder obtener una mejor caracterización de las nanopartículas se utilizó la microscopia de fuerzas atómicas. Para ello se modificaron dos placas de oro con los

dos tipos de nanopartículas de diamante utilizadas, como se indica en el apartado 4.5.3. de materiales y métodos. En la figura 1.1.2 A se muestra la imagen de AFM de un depósito de DNPs de 9 nm sobre un sustrato de oro. La imagen obtenida presenta una gran rugosidad relativa de la superficie, de aproximadamente 12 nm. Además, también se pueden observar estructuras con tamaños laterales de entre 10 y 30 nm, debido, por un lado, a los efectos de convolución de la punta, y por otro, a la gran tendencia de las nanopartículas de diamante a agregarse. Sin embargo, el contorno de las estructuras nanogranulares se puede apreciar con gran nitidez. Del mismo modo, se obtuvo la imagen de las DNPs de menor tamaño donde se observa una imagen muy similar a la obtenida con las nanopartículas de 9 nm (figura 1.1.2 B). Igualmente, presenta una elevada rugosidad de la superficie y se aprecian claramente los contornos de las nanopartículas.

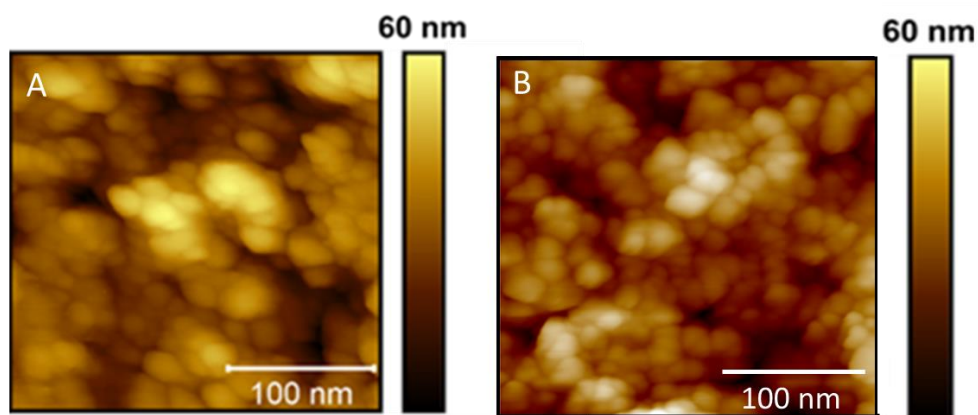


Fig. 1.1.2. Imagen AFM en modo contacto intermitente, $250 \times 250 \text{ nm}^2$, de un depósito de DNPs9 (A) y un depósito de DNPs4 (B) sobre sustrato de oro.

Hasta ahora, el tamaño de las nanopartículas de diamante se ha considerado teniendo en cuenta las especificaciones facilitadas por el fabricante. Para confirmar este dato, se obtuvo la distribución de tamaños de las DNPs, y su correspondiente valor medio, mediante AFM. Para estos estudios se necesita tener una superficie lo

más plana posible y, además, evitar la agregación de las nanopartículas. Por ello se empleó como soporte un material extremadamente plano, el silicio, y otra estrategia de modificación de las placas, desarrollada en el apartado 4.6. de materiales y métodos, basada en la modificación bajo sonicación. Las imágenes de AFM de dos placas de silicio modificadas con ambos tipos de nanodiamante, siguiendo la estrategia mencionada, se presentan en la figura 1.1.3. En las imágenes se pueden observar algunas nanopartículas dispersas sobre la superficie del silicio, aunque también existen algunos agregados. Para poder estimar el diámetro de las nanopartículas, se midió la altura de aquellas imágenes que no presentan signos de agregación. Se analizó la altura en lugar de la medida lateral porque esta última se ve muy afectada por los efectos de convolución de la punta.

En el caso de las DNP's de mayor tamaño se analizó la altura de más de 300 nanopartículas diseminadas sobre la superficie (figura 1.1.3 A) y se obtuvo el histograma que se presenta en la figura 1.1.3 B, resultando un diámetro medio de 9 ± 3.6 nm. En el caso de las nanopartículas de menor tamaño se analizó la altura de más de 270 nanopartículas diseminadas sobre la superficie (figura 1.1.3 C) obteniéndose el histograma de la figura 1.1.3 D. En este caso se obtuvo un diámetro medio 3.7 ± 1.5 nm. Por tanto, los resultados experimentales corroboran la información facilitada por el fabricante sobre el tamaño de las nanopartículas.

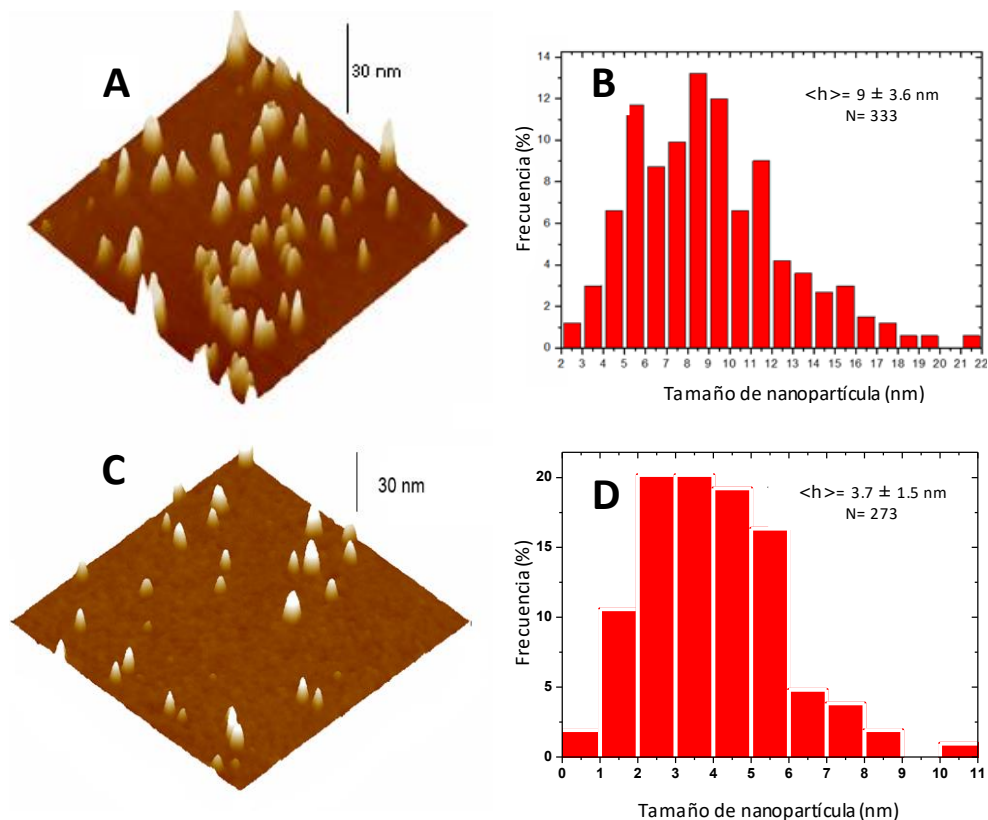


Fig. 1.1.3. Imagen AFM en modo contacto intermitente, $500 \times 500 \text{ nm}^2$, de una placa de silicio modificado con A) DNP9 y C) DNP4. Histograma de la altura medida de B) 333 nanopartículas DNP9 y D) 273 nanopartículas DNP4, depositadas sobre la superficie de silicio.

1.1.1.3. Caracterización de las DNPs mediante espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman permite obtener información estructural, de la composición y de la homogeneidad de un material, por lo que es una de las técnicas no destructivas más populares para la caracterización estructural de materiales de carbono. Los espectros de estos materiales suelen presentar dos picos, el D y el G, entre 1600 y 1350 cm^{-1} , para longitudes de ondas de excitación en el visible. El pico G aparece más concretamente a $\approx 1590 \text{ cm}^{-1}$, está asociado a los movimientos de vibración en el plano de los carbonos sp^2 y se da con mayor intensidad en redes

amorfos. El pico D, asociado a movimientos de vibración fuera del plano de los carbonos sp^2 , aparece aproximadamente a 1400 cm^{-1} y con mayor intensidad en materiales ordenados. Por tanto, la relación de intensidades $I(D)/I(G)$ es un indicador del grado de desorden del sistema [Ferrari, 2001]. En el caso concreto de las DNP's, la interpretación de los espectros Raman no es sencilla ya que este depende de la estructura, la pureza, la relación sp^2/sp^3 , del tamaño del cristal y de la química superficial.

Continuando con la caracterización de las DNP's, se obtuvieron los espectros Raman de ambos tipos de nanodiamante depositados sobre una placa de oro activada, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.7 de Materiales y métodos. Como se observa en la figura 1.1.4, ambos espectros muestran dos picos bien definidos correspondientes a los picos D y G característicos de los materiales de carbono [Mochalin, 2012]. Las curvas se han ajustado usando una función Lorentziana para el caso de la banda D y una función Breit–Wigner–Fano (BWF) en el caso de la banda G [Ferrari, 2000].

Las DNP's9 presentan los dos picos, el D y el G, a 1358 y 1575 cm^{-1} , respectivamente, mientras que para DNP's4 aparecen a 1337 y 1579 cm^{-1} . En concreto, el pico D en ambos casos, aparece ligeramente desplazado hacia números de onda menores, cercano a los 1332 cm^{-1} a los que aparece el pico del diamante [Solin, 1970]. Este desplazamiento es mayor para el caso de las DNP's4, esto puede deberse a que este rodeado de una capa mas fina de carbono gráfico, lo que hace posible ver una mayor contribucion de los carbonos sp^3 [Mochalin, 2012].

Se calculó la relación de intensidades $I(D)/I(G)$ para ambos tipos de nanopartícula, obteniéndose un resultado de 0.72 ± 0.05 y 0.63 ± 0.01 , obtenidos de la media de 5 espectros, para DNP's9 y DNP's4 respectivamente, por lo que podemos decir, en ambos casos, que se trata de nanomateriales con cierto grado de desorden.

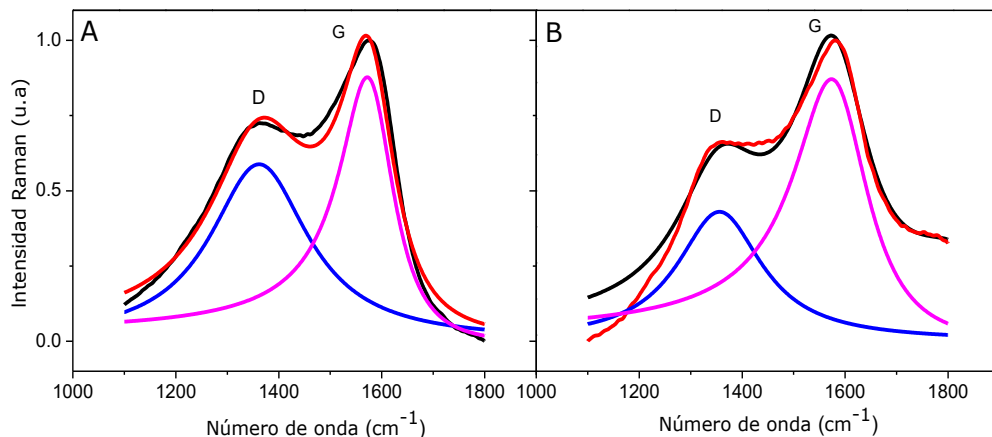


Fig. 1.1.4. Espectro Raman de las DNP9 (A) y DNP4 (B). La línea negra es el espectro real obtenido, la línea roja corresponde al ajuste del espectro y las líneas azul y rosa corresponden a los ajustes de las bandas D y G respectivamente. (λ_{exc} del láser 532 nm, potencia del láser 10 mW, tiempo de integración 0.5 s, objetivo 5x).

1.1.1.4. Caracterización de las DNPs mediante espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

Dependiendo de las condiciones específicas de síntesis y de los procesos de purificación empleados en su fabricación, las nanopartículas de diamante pueden presentar diferentes grupos funcionales en su superficie. Para caracterizar estos grupos funcionales, se obtuvieron los espectros de FTIR de ambos tipos de nanopartícula. Como se puede observar en la figura 1.1.5, no existe gran diferencia entre ambos espectros. Se pueden observar varias bandas asociadas a grupos funcionales que contienen oxígeno. En concreto, se pueden observar las bandas a $1000\text{--}1150\text{ cm}^{-1}$ correspondientes a las flexiones C-O asimétricas de éteres alifáticos ($\equiv\text{C-O-C}\equiv$), a $1620\text{--}3420\text{ cm}^{-1}$ las bandas de flexión O-H y tensión O-H respectivamente, y a 1386 cm^{-1} la banda correspondiente a C=O. Además, se pueden observar también las bandas asociadas a la tensión de los enlaces C-H ($2700\text{--}2900\text{ cm}^{-1}$) [Holt, 2010].

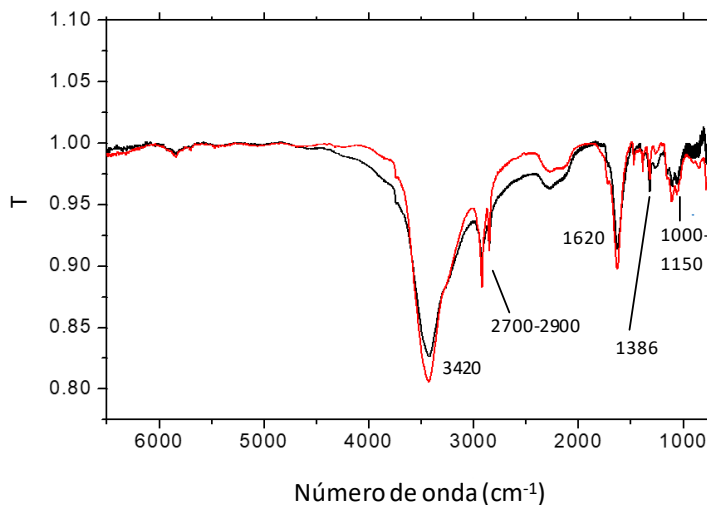


Fig. 1.1.5. Espectro FTIR de las DNPs9 (—) y DNPs4 (—).

1.1.1.5. Caracterización de las DNPs mediante medida del potencial Zeta

La medida del potencial Zeta de una dispersión está relacionada con su estabilidad y depende de los grupos funcionales presentes en la superficie de las partículas y del pH de la solución, de forma que, si existe una alta repulsión entre las partículas debido a su carga superficial, obtendremos un valor absoluto de potencial Zeta elevado mientras que, si obtenemos un valor absoluto bajo, indica que no existe dicha repulsión.

Se estudió la variación de la carga superficial de las DNPs a dos pHs distintos mediante la medida del potencial Zeta. Se obtuvo el valor del potencial Zeta de las DNPs4 y DNPs9 a pH 5.5 y a pH 7.0. En la figura 1.1.6 A se presentan los valores de potencial Zeta de las nanopartículas medidos a pH 5.5. Para el caso de las DNPs9 se obtiene un valor de 24 ± 2.0 mV mientras que para las DNPs4 el valor es de 21.8 ± 1.6 mV. El valor es muy similar en los dos casos y cercano a 25 mV lo que indica que las DNPs están dispersas. Además, el signo positivo concuerda bien con la presencia

de carbonos sp^2 en la superficie de las nanopartículas, debidos a los grupos funcionales oxigenados presentes en ella [Laia, 2017].

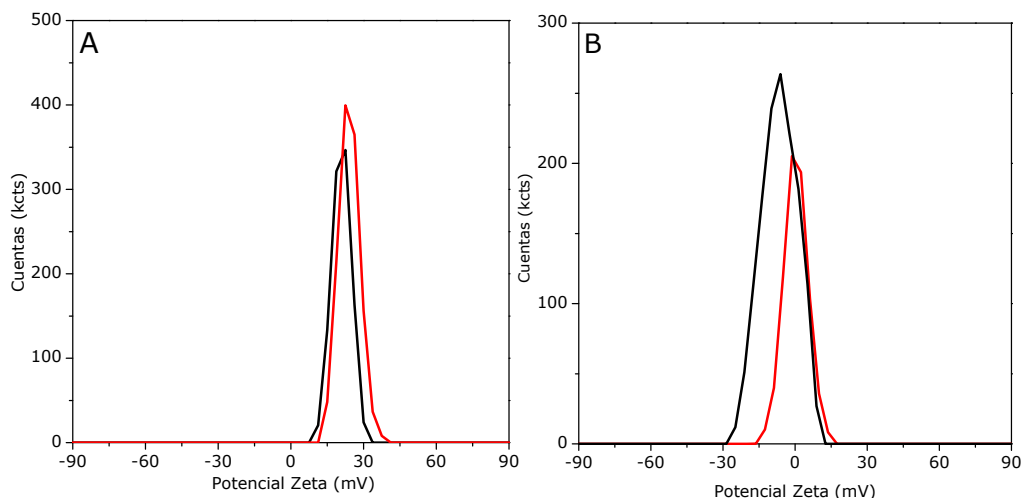


Fig. 1.1.6. (A) Potencial Zeta de las DNPs4 (—) y las DNPs9 (—) a pH 5.5. (B) Potencial Zeta de las DNPs4 (—) y las DNPs9 (—) a pH 7.0.

Los datos obtenidos para las nanopartículas a pH 7.0 se presentan en la figura 1.1.6 B. En este caso, el valor obtenido para las DNPs4 es de -6.2 ± 0.3 mV mientras que para DNPs9 es de -0.9 ± 2.4 mV. El valor absoluto del potencial Zeta indica que las dispersiones a este pH son menos estables pero, además, entre ambos tipos de nanopartícula existe mayor diferencia, siendo más negativo en el caso de las DNPs4, lo que indica diferente carga superficial que puede influir en su reactividad. La mayor carga negativa en el caso de las DNPs4 puede explicarse debido a la existencia de una mayor proporción de grupos carboxilos en la superficie de estas nanopartículas respecto de las DNPs9. A pHs más básicos estos grupos carboxilo se desprotonan generando la carga negativa en la superficie de las nanopartículas, mientras que, a pHs más ácidos, la ionización de los grupos hidroxilo es lo que generan la carga superficial positiva.

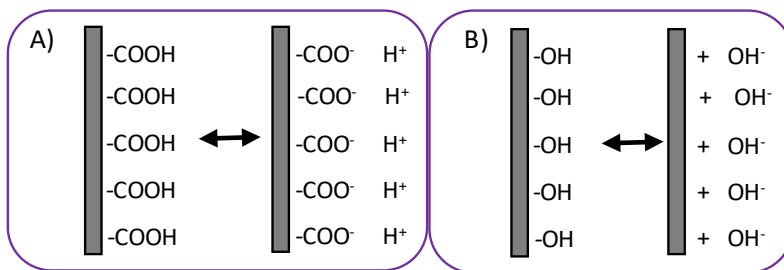


Fig. 1.1.7. Origen de la carga superficial negativa, por ionización de los grupos carboxilo (A) y, positiva, por ionización de los grupos hidroxilo (B) [Khoshnevisan, 2015].

1.1.2. CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DE LAS DNP's

1.1.2.1. Caracterización de las DNP's mediante voltamperometría diferencial de impulsos (DPV)

Aunque el diamante presenta un carácter aislante debido a su elevado salto de banda (5.47 eV), las DNP's, gracias a los grupos funcionales presentes en su superficie, pueden presentar actividad electrocatalítica, ya que los orbitales moleculares de estos grupos se superponen, dando lugar a estados electrónicos π y π^* , cuyos valores energéticos están dentro del salto de banda del diamante [Holt, 2009; Holt, 2010; Varley, 2014]. Las energías de estos estados energéticos dependen de distintos factores como los grupos funcionales y el número de átomos vecinos. Estos estados electrónicos no están completos por lo que pueden oxidarse y reducirse dependiendo del potencial aplicado al electrodo o de la sonda redox. Por ello se estudió el comportamiento electroquímico de las nanopartículas de diamante depositando estas sobre electrodos de oro. En primer lugar, se obtuvo el voltamperograma diferencial de impulsos (DPV) (figura 1.1.8) de un electrodo de oro modificado con DNP's9 (DNP's9/Au), en tampón fosfato 0.1 M a pH 7.0. El blanco obtenido para el electrodo de oro en la misma disolución tampón se restó para así

asegurar que la respuesta es debida al nanomaterial. Como se puede observar en la figura 1.1.8, se obtienen cuatro picos bien definidos, desde -0.3 V a +0.7 V (-0.22 V, +0.05 V, +0.23 V y +0.52 V), correspondientes a los procesos de oxidación/reducción de los grupos funcionales presentes en la superficie de las nanopartículas de diamante.

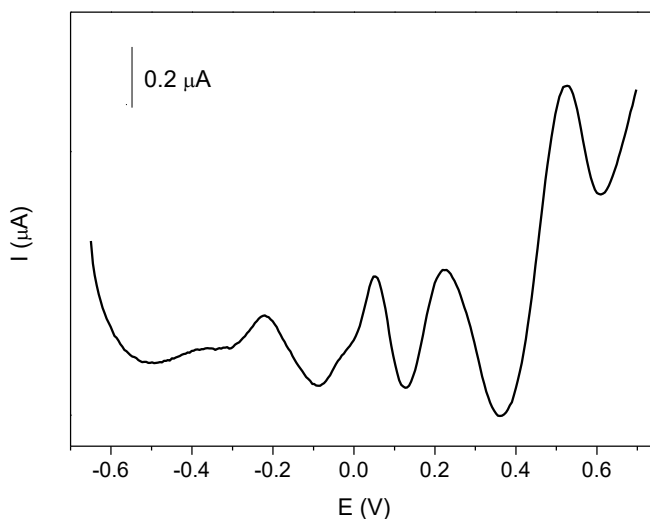


Fig. 1.1.8. DPV del sistema DNP9/Au en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0. Velocidad de barrido: 25 mV s^{-1} .

1.1.2.2. Caracterización de las DNP9 mediante voltamperometría cíclica (CV)

Con el fin de estudiar con mayor profundidad los procesos electroquímicos que presentan las nanopartículas de diamante se realizaron estudios mediante voltamperometría cíclica. En la figura 1.1.9 se presentan los voltamperogramas cíclicos obtenidos tanto del electrodo de oro (Au) como del electrodo de oro modificado con las DNP9/Au en tampón fosfato 0.1 M a pH 7.0. Como se puede observar, al modificar la superficie de oro con las nanopartículas se produce un aumento de la corriente capacitativa, debido al aumento del área superficial

relativa del electrodo como consecuencia de su nanoestructuración. Sin embargo, no se aprecia ninguna señal correspondiente a las DNP's debido a que la CV es una técnica menos sensible que la DPV, en particular en sistemas donde se producen corrientes capacitativas altas, que pueden enmascarar los procesos electroquímicos.

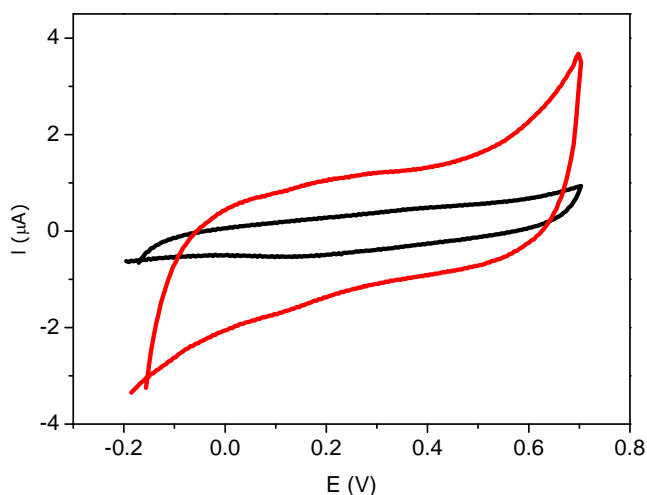


Fig. 1.1.9. Voltamperograma cíclico del electrodo de oro (—) y del electrodo de oro modificado con DNP's9 (—) en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0. Velocidad de barrido: 100 mV s^{-1} .

1.1.2.3. Comportamiento electroquímico de los electrodos de oro nanoestructurados con DNP's

Se estudió el comportamiento electroquímico de los electrodos modificados con nanodiamante utilizando el hidroximetil ferroceno (HMF) como sonda redox. En la figura 1.1.10 se presenta la respuesta ciclovoltamperométrica del electrodo DNP's9/Au en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0, en ausencia y en presencia de HMF 1.0 mM obtenida a una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} . El electrodo DNP's9/Au presenta una respuesta reversible, obteniéndose un par de picos redox bien

definidos, típicos del proceso HMF (FeII)/HMF (FeIII) en medio acuoso, a un potencial formal de +0.30 V, lo que sugiere unas buenas propiedades conductoras y la difusión rápida del mediador hacia el electrodo.

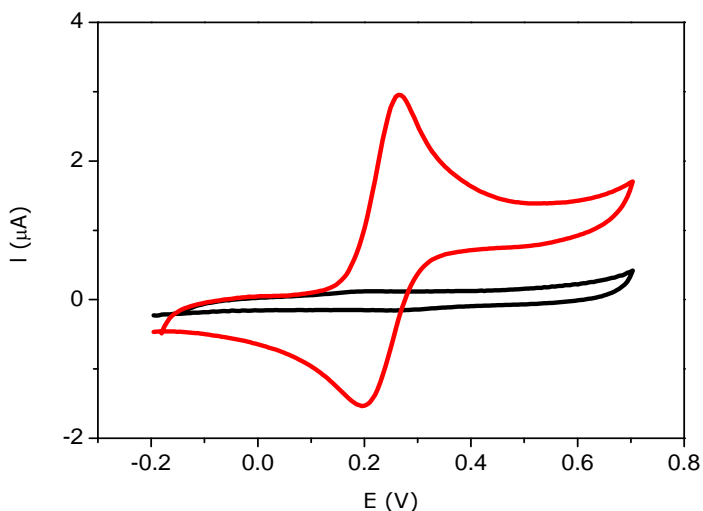


Fig. 1.1.10. Voltamperograma cíclico del electrodo DNP9/Au en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 en ausencia (—) y en presencia de HMF 1.0 mM (—). Velocidad de barrido: 10 mV s⁻¹.

Si comparamos los voltamperogramas cíclicos obtenidos para un electrodo de oro sin modificar y modificado con DNP9 en presencia de HMF (figura 1.1.11), se observa un incremento en la intensidad de corriente de los picos anódico y catódico en presencia de las nanopartículas.

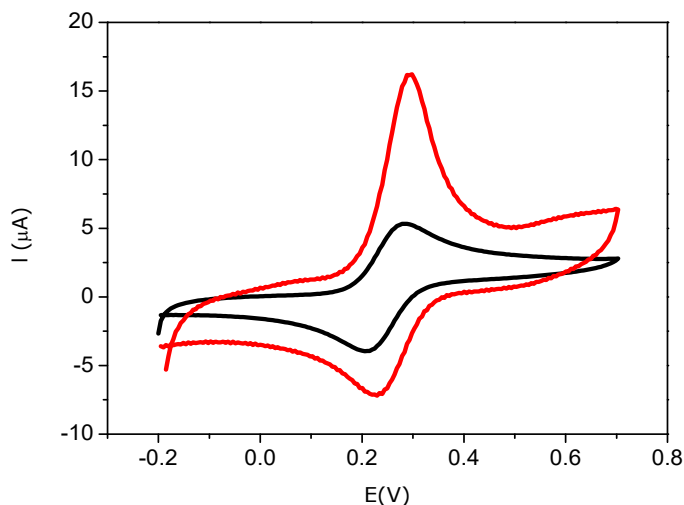


Fig. 1.1.11. Voltamperograma cíclico del electrodo de oro sin modificar (—) y modificado con DNP9 (—) en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 en presencia de HMF 1.0 mM. Velocidad de barrido: 100 mV s^{-1} .

Estos aumentos de corriente pueden explicarse teniendo en cuenta que las DNPs provocan un aumento del área superficial relativa y, además, pueden experimentar procesos de óxido-reducción como consecuencia de la existencia de estados redox en su superficie. El mecanismo que tendría lugar sería el siguiente:

En el barrido anódico tiene lugar la oxidación de HMF (FeII) a HMF (FeIII) sobre el electrodo de oro. Seguidamente, se transfiere un electrón de la superficie del DNPs al HMF (FeIII), permitiendo que el HMF (FeIII) generado en la superficie del electrodo de oro se reduzca rápidamente a HMF (FeII). Como consecuencia de este mecanismo de retroalimentación, la corriente de oxidación se incrementa. En el barrido catódico tiene lugar el proceso contrario, aumentando la corriente de reducción [Varley, 2014] (figura 1.1.12).

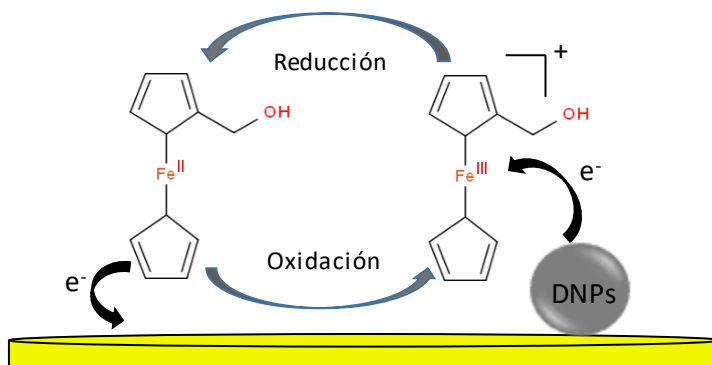


Fig. 1.1.12. Esquema del mecanismo de retroalimentación.

El mecanismo de retroalimentación propuesto se fundamenta en el hecho de que, como puede observarse en la figura 1.1.8, las DNP4 pueden oxidarse a un potencial similar al HMF [Holt, 2009].

En el caso del electrodo de oro modificado con DNP4 (figura 1.1.13), además del par redox característico del HMF, aparece un pico a un potencial aproximado de +0.15 V. Este prepico no aparece cuando se obtiene el voltamperograma cíclico del electrodo DNP4/Au en tampón fosfato en ausencia de HMF, por tanto, no está relacionado sólo con las DNP4, sino con un proceso que implica también al HMF. Además, se puede observar que el incremento de las corrientes de oxidación y reducción en este caso son menores que en el caso del electrodo modificado con las nanopartículas grandes. Este hecho puede explicarse ya que, como está descrito en la bibliografía, el aumento que se observa en ambas corrientes, de oxidación y de reducción, depende de la disponibilidad de los grupos funcionales presentes en la superficie de las DNP4, y que participan en el mecanismo de retroalimentación. La concentración de estos grupos funcionales depende tanto del tamaño de las nanopartículas como de la densidad de dichos grupos en la superficie de la nanopartícula [Varley, 2014].

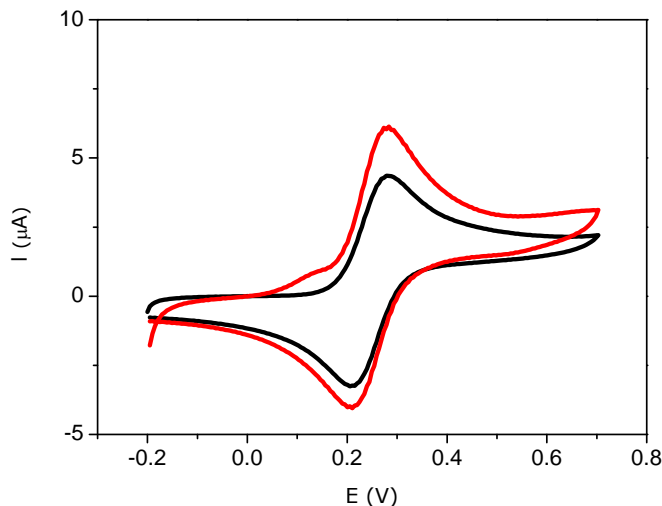


Fig. 1.1.13. Voltamperograma cíclico del electrodo de oro sin modificar (—) y modificado con DNP4 (—) en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 en presencia de HMF 1.0 mM. Velocidad de barrido: 100 mV s^{-1} .

Se estudió el comportamiento electroquímico de los electrodos DNP's/Au midiendo la separación entre el pico anódico y el pico catódico. Los valores se obtuvieron de la media de tres réplicas, siendo para el caso del electrodo DNP's9/Au de $0.08 \pm 0.02 \text{ V}$ y para el caso del electrodo DNP's4/Au de $0.079 \pm 0.007 \text{ V}$. Se obtiene en ambos casos el mismo valor, por tanto, la modificación con ambos tipos de nanopartícula tiene un efecto idéntico en el comportamiento electroquímico de ambos. Si se compara con el valor obtenido para el electrodo de oro no modificado ($0.076 \pm 0.007 \text{ V}$), podemos decir que la nanoestructuración con las DNP's no afecta a la reversibilidad del proceso. En todos los casos se obtiene un valor algo mayor al que correspondería para un sistema reversible, en difusión que intercambia un solo electrón, lo que denota una cierta irreversibilidad, provocada por la propia superficie del electrodo de Au.

Con el objetivo de estudiar el origen del prepico observado en la figura 1.1.13, se obtuvieron los voltamperogramas cíclicos de un electrodo de oro modificado con

DNPs4 en disolución tampón fosfato 0.1 M a pH 7.0 en presencia de HMF 1.0 M a distintas velocidades de barrido. Se estudió el comportamiento de ambos picos, el pico principal a +0.30 V y el prepico a +0.15 V, frente a la velocidad de barrido y frente a su raíz cuadrada. Como se puede observar en la figura 1.1.14, la intensidad del prepico aumenta con la velocidad de barrido, pero se va volviendo menos definido hasta que, para velocidades de barridos iguales o superiores a 100 mV s^{-1} , acaba convirtiéndose en un hombro del pico principal y, finalmente, desaparece a velocidades de barrido mayores.

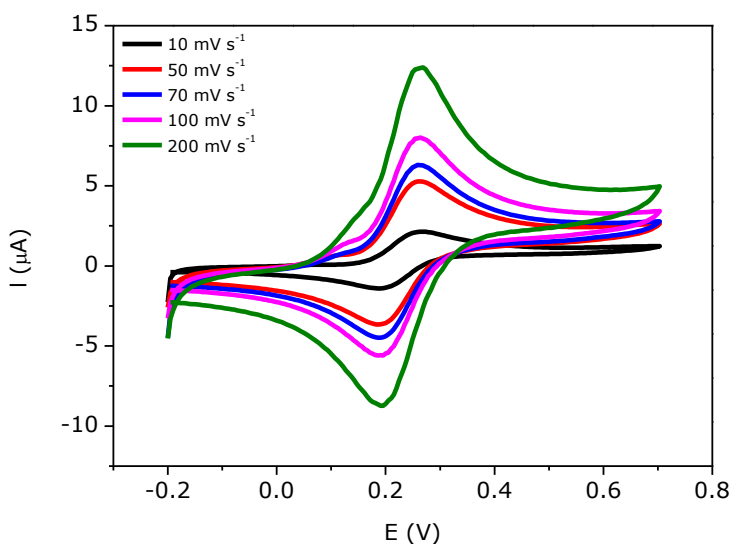


Fig. 1.1.14. Voltamperograma cíclico de DNPs4/Au en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 en presencia de HMF 1.0 mM a diferentes velocidades de barrido: 10 mV s^{-1} , 50 mV s^{-1} , 70 mV s^{-1} , 100 mV s^{-1} y 200 mV s^{-1} .

Se representaron las intensidades de pico anódico, tanto del pico principal como del prepico, frente a la velocidad de barrido y frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, para determinar si el proceso está controlado por difusión o por adsorción. Para llevar a cabo las representaciones sólo se tuvo en cuenta el

intervalo de velocidades de 10 a 100 mV s^{-1} ya que, como se mencionó anteriormente, a partir de esta velocidad de barrido el prepico no se define lo suficiente como para poder medir su corriente de pico. Como se observa en la figura 1.1.15 B, la representación de la corriente de pico anódica del pico principal frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido se ajusta a una línea recta, mientras que frente a la velocidad de barrido (figura 1.1.15 A) se ajusta a una curva, indicando que el proceso redox está controlado por difusión.

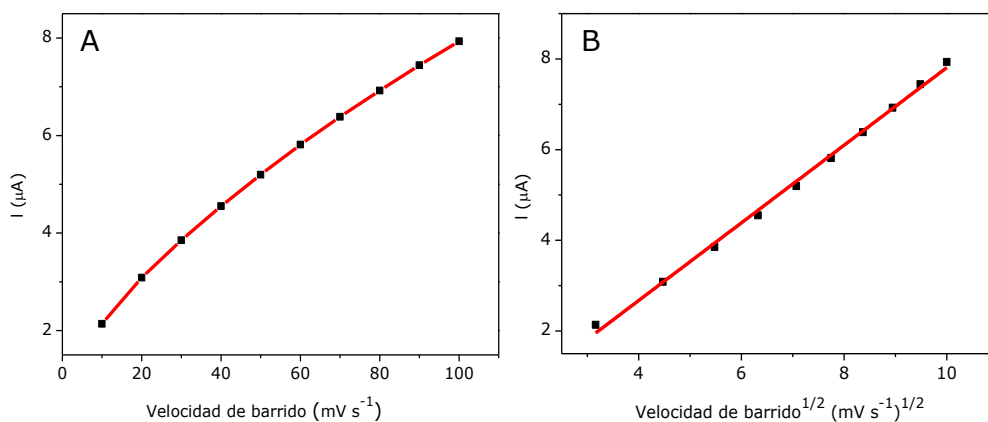


Fig. 1.1.15. Representación de la intensidad de corriente anódica a +0.30 V frente a la velocidad de barrido (A) y frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido (B).

Sin embargo, para el caso del prepico se observa lo contrario. La representación de la corriente de pico anódico frente a la velocidad de barrido da una línea recta (figura 1.1.16 A), sugiriendo que el proceso está controlado por adsorción. Por tanto, el prepico es un pico de adsorción debido a que el HMF está parcialmente anclado a la superficie de las DNP's. Esto concuerda con lo descrito en la bibliografía para estudios de infrarrojo, donde se confirma la afinidad electrostática de la forma oxidada del HMF, HMF (FeIII), por las nanopartículas de diamante cargadas negativamente [Varley, 2014]. La carga negativa de las nanopartículas de diamante comerciales proviene de los pasos de limpieza que dejan grupos

oxigenados sobre la superficie, sobre todo grupos carboxilo [Williams O.A., 2010]. Esta carga, como se ha comprobado con las medidas del potencial Zeta (figura 1.1.6), dependen también del pH de la medida. En este caso a pH más básicos (pH 7.0) las DNPs4 tienen carga más negativa que las DNPs9, lo que justifica su diferente comportamiento respecto a la adsorción de la forma oxidada del HMF.

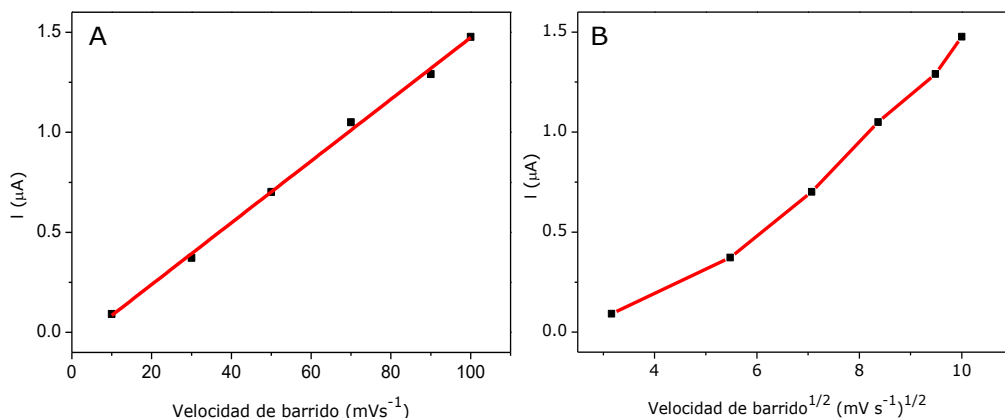


Fig. 1.1.16. Representación de la intensidad de corriente anódica a +0.15 V frente a la velocidad de barrido (A) y frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido (B).

Por tanto, podemos decir que el prepico está asociado a un proceso de absorción en la superficie de las DNPs4, es decir, el HMF(FeIII) puede, no sólo absorberse sobre el DNPs4, sino que, también, puede formar parte del mecanismo de retroalimentación. Ya que los potenciales de las sustancias adsorbidas no son exactamente los mismos que cuando se encuentran en disolución, el prepico aparece a un potencial ligeramente menor que el del pico principal.

1.1.2.4. Respuesta del prepico frente a pH

Como se ha comentado anteriormente, la carga de las nanopartículas de diamante depende del pH, por tanto, se estudió el efecto del pH en la respuesta del electrodo

DNPs4/Au en la oxidación/reducción del HMF. Como se puede observar en la figura 1.1.17, en el caso del pico principal, tanto el pico catódico como el pico anódico mantienen los valores de potencial y de intensidad de corriente constantes con el pH, como era de esperar para la oxidación/reducción del HMF ya que los iones H^+ no están involucrados en el proceso. Sin embargo, el pH juega un papel clave en el caso del prepico, como ya se ha comentado. Para pH menores de 6.0, el prepico no aparece, sugiriendo que, en estas condiciones de trabajo, los grupos funcionales de la superficie de las DNPs4 (como ácidos carboxílicos) están probablemente protonados y por tanto la adsorción de HMF no tiene lugar, datos que concuerdan con los valores de potencial Zeta obtenidos (figura 1.1.6).

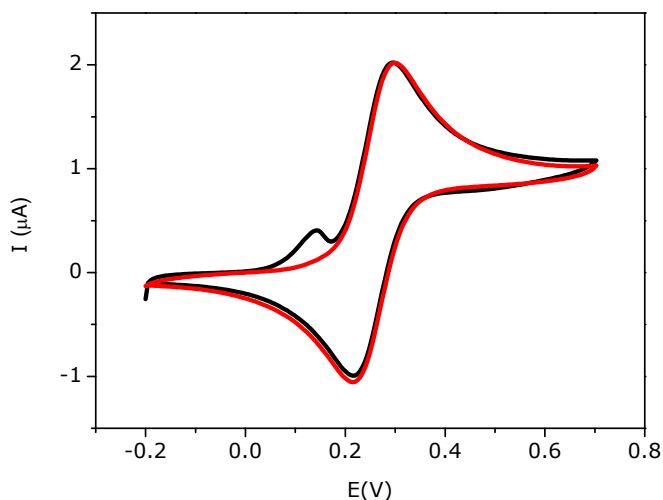


Fig. 1.1.17. Voltamperograma cíclico de DNPs4/Au en presencia de HMF 1.0 mM a pH 4.5 (—) y pH 7.0 (—). Velocidad de barrido: 10 mV s^{-1} .

1.2

**BIOSENSORES 2D DE GLUCOSA O LACTATO BASADOS EN
ELECTRODOS DE ORO NANOESTRUCTURADOS CON
NANOPARTÍCULAS DE DIAMANTE DE 9 nm**

En la introducción ya se ha comentado que uno de los pasos más importantes en el desarrollo de un biosensor es la inmovilización del elemento de reconocimiento sobre el transductor. Cuando el elemento de reconocimiento es un enzima, el tipo de inmovilización puede condicionar su actividad enzimática dependiendo de la conformación que tome en la inmovilización [Khan A.A., 2010]. Entre los métodos de inmovilización más comunes, la adsorción física [Nanduri, 2007] emplea una combinación de enlaces tipo fuerzas de Van der Waals y fuerzas hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y fuerzas iónicas para unir el biomaterial a la superficie del sensor de una manera simple y rápida [Monošík, 2012], por tanto es una forma rápida y sencilla de inmovilización.

En el presente trabajo, se desarrolló un biosensor de glucosa y un biosensor de lactato empleando las DNPs9 como nanomaterial para la nanoestructuración del electrodo y, como elemento de reconocimiento, la glucosa oxidasa (GOx), en el primer caso, o la lactato oxidasa (LOx), en el segundo caso, empleando la adsorción física como método de inmovilización tanto del nanomaterial como del elemento de reconocimiento.

1.2.1. Desarrollo del biosensor de glucosa o lactato

Como ya se describió en el apartado 4.3 de materiales y métodos, para el desarrollo del biosensor electroquímico nanoestructurado con las DNPs9, la enzima se inmovilizó por adsorción directa sobre el electrodo de oro, previamente modificado con 5 μL de una suspensión de DNPs9 de concentración 1 mg mL^{-1} , siguiendo el esquema de la figura 1.2.1. En primer lugar, se empleó la enzima GOx como elemento de reconocimiento (GOx/DNPs9/Au) y se utilizó como modelo para el estudio del sistema. Posteriormente, se desarrolló, siguiendo el mismo

procedimiento, un biosensor para la detección de lactato, empleando como elemento de reconocimiento la enzima lactato oxidasa (LOx/DNPs9/Au).

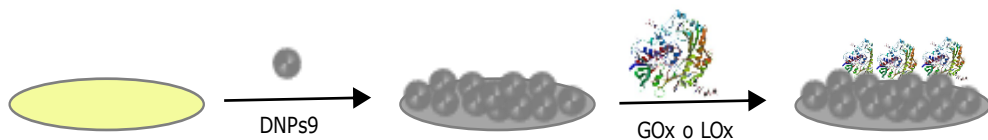


Fig. 1.2.1. Esquema de preparación del biosensor enzimático nanoestructurado con DNPs9.

1.2.2. Caracterización de las distintas etapas de desarrollo del biosensor

1.2.2.1. Caracterización morfológica mediante AFM

En primer lugar, se obtuvieron las imágenes de AFM de las superficies obtenidas en las distintas etapas del desarrollo del biosensor, las superficies DNPs9/Au y GOx/DNPs9/Au. Si se comparan las imágenes obtenidas para ambas superficies (figura 1.2.2) se puede observar, como ya se comentó en el apartado 1.1 de este capítulo, que en el caso de la superficie DNPs9/Au se aprecia una gran rugosidad relativa de la superficie, debido, por un lado, a los efectos de convolución de la punta y, por otro, a la gran tendencia de las nanopartículas de diamante a agregarse, sin embargo, se observa con gran nitidez el contorno de las estructuras nanogranulares. En el caso de la imagen obtenida de la superficie modificada con la GOx, GOx/DNPs9/Au, las estructuras granulares no se observan tan nítidas. De nuevo, los efectos de convolución de la punta están presentes, sobre todo en aquellas estructuras que están más en la superficie. En este caso, la rugosidad relativa de la superficie es de aproximadamente 4 nm, lo que puede ser debido al alisamiento de la superficie por el depósito de la enzima GOx. En cuanto al tamaño de las estructuras, se pueden observar estructuras de en torno a 30 nm, pero

también algunas más pequeñas de 6-15 nm. Este intervalo de tamaños, desde 6 nm a 15 nm, es algo que no sorprende, teniendo en cuenta que, tanto las DNPs9 como la GOx, tienen un tamaño similar. Además, las dificultades para distinguirlos se agravan por los efectos de convolución de la punta.

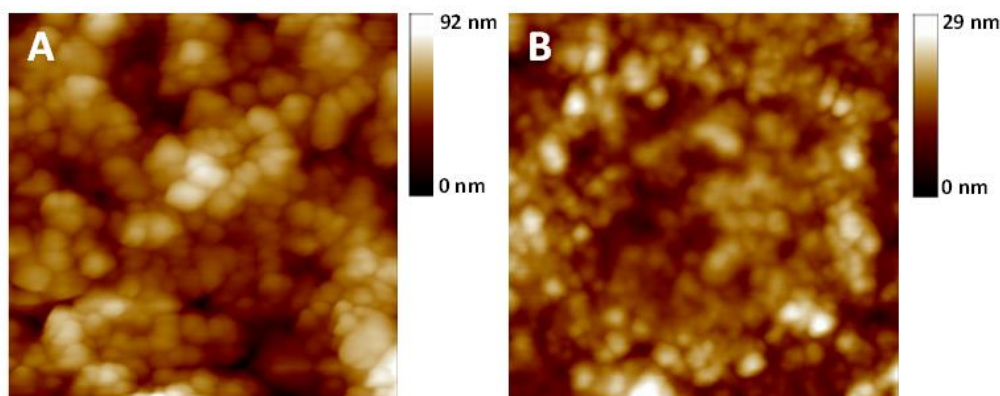


Fig. 1.2.2. Imagen AFM en modo contacto intermitente $400 \times 400 \text{ nm}^2$, de los sistemas DNPs9/Au (A) y GOx/ DNPs9 /Au (B).

Por tanto, para hacer una mejor caracterización del depósito de la enzima, se obtuvieron las curvas de fuerza de ambas superficies. En la figura 1.2.3 se representan las curvas de fuerza obtenidas para DNPs9/Au y GOx/DNPs9/Au, este último medido en distintos puntos de la muestra. Ambas superficies presentan una región de cero deflexión, correspondiente a la situación en que la punta se encuentra lejos de la superficie. Para el caso de la superficie DNPs9/Au se obtiene una línea recta, de pendiente 1, cuando el cantilever toca la superficie de la muestra. Esta región también se observa en la superficie biosensora GOx/DNPs9/Au, pero para un mayor desplazamiento del piezo. En este caso, tras la zona de cero deflexión, se aprecia una zona curva inmediatamente después de que la punta toque la superficie, que se corresponde con la parte blanda del depósito de la enzima. En este caso, todas las curvas obtenidas en distintos puntos para la

superficie GOx/DNPs9/Au, acaban llegando a la zona con pendiente 1, lo que indica que se ha alcanzado el DNPs9 que hay bajo el depósito de la enzima. Por tanto, el intervalo entre DNPs9/Au y GOx/DNPs9/Au para valores de deflexión altos (marcadas por las líneas horizontales discontinuas) se corresponderán con el grosor de la capa de GOx. Para las curvas presentadas en la figura 1.2.3, los valores de grosor obtenidos varían entre 9.5 nm y 18 nm. Hay que resaltar que también se realizaron medidas de curvas de fuerzas en la que no se llegó a alcanzar la región de pendiente 1, esto quiere decir que, para esa fuerza aplicada, la capa de GOx seguía presente. Por tanto, estos resultados indican que la GOx está depositada sobre la superficie de DNPs9/Au con un grosor variable (desde una monocapa a varias capas), lo que concuerda con las imágenes obtenidas por AFM de ambas superficies (figura 1.2.2).

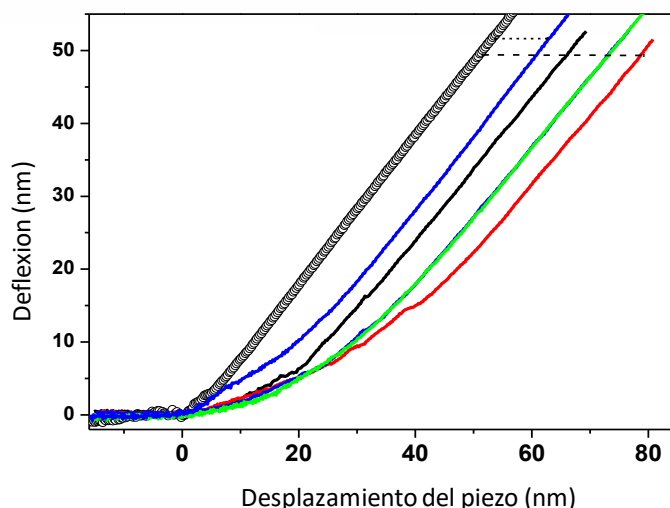


Fig. 1.2.3. Curvas de fuerza características obtenida para las superficies DNPs9/Au (línea gris) y sobre diferentes puntos de la superficie biosensora GOx/DNPs9/Au (línea azul, negro, verde y roja). Las líneas horizontales corresponden a la medida del intervalo entre DNPs9/Au y GOx/DNPs9/Au para valores altos de deflexión.

1.2.2.2. Caracterización morfológica mediante SEM

Se obtuvo también la imagen SEM de la superficie biosensora GOx/DNPs9/Au. A pesar de que no se observa un gran contraste, debido a las características de la muestra, en la figura 1.2.4 se puede apreciar con claridad las estructuras del depósito de la enzima, confirmándose, también mediante esta técnica, la obtención de un adecuado depósito de enzima sobre las DNPs.

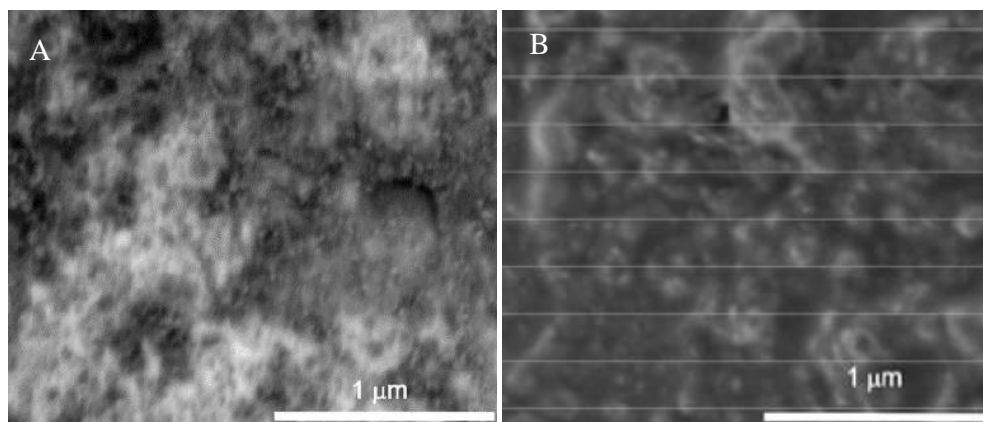


Fig. 1.2.4. Imagen FE-SEM de la superficie DNPs9/Au (A) GOx/DNPs9/Au (B).

1.2.2.3. Caracterización mediante espectroscopia Raman

También se obtuvieron los espectros Raman de las distintas etapas del desarrollo del biosensor. En la figura 1.2.5 se presentan los espectros Raman obtenidos para la superficie DNPs9/Au (—), GOx/Au (—) y GOx/DNPs9/Au (—). Como se puede observar, el espectro obtenido de las nanopartículas de diamante de 9 nm depositadas sobre la placa de oro muestra los picos D y G característicos de los nanomateriales de carbono. La placa modificada con GOx (GOx/Au) presenta una serie de picos pequeños entre 750 y 1750 cm^{-1} y un pico más definido a 3000 cm^{-1} . Al modificar la placa de oro primero con DNPs9 y luego con GOx, se observa el

espectro correspondiente al depósito de la enzima, pero en este caso el pico a 3000 cm^{-1} aparece con algo menos de intensidad.

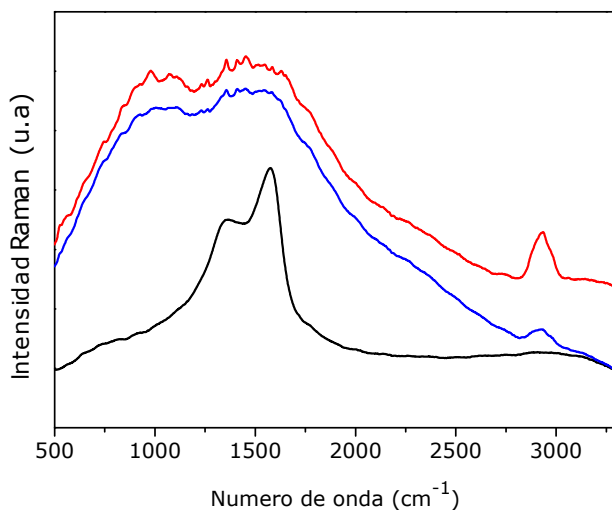


Fig. 1.2.5. Espectros Raman de las superficies DNP9/Au (—), GOx/DNP9/Au (—) y GOx/Au (—).

Con el objetivo de conocer si el origen del pico a 3000 cm^{-1} se debe al Flavin Adenín Dinucleótido (FAD), cofactor de la enzima [Rassaei, 2014], se obtuvo también el espectro Raman de una placa de oro modificada con FAD, y se comparó con el espectro de esta. En la figura 1.2.6, las microestructuras que aparecen entre 750 y 1750 cm^{-1} se corresponde con el espectro del FAD libre y concuerdan con la bibliografía encontrada [Li J., 2006], mientras que el pico a 3000 cm^{-1} solo aparece en el espectro de la superficie GOx/Au, lo que indicaría que este se debe a la parte proteica de la enzima, la apoenzima.

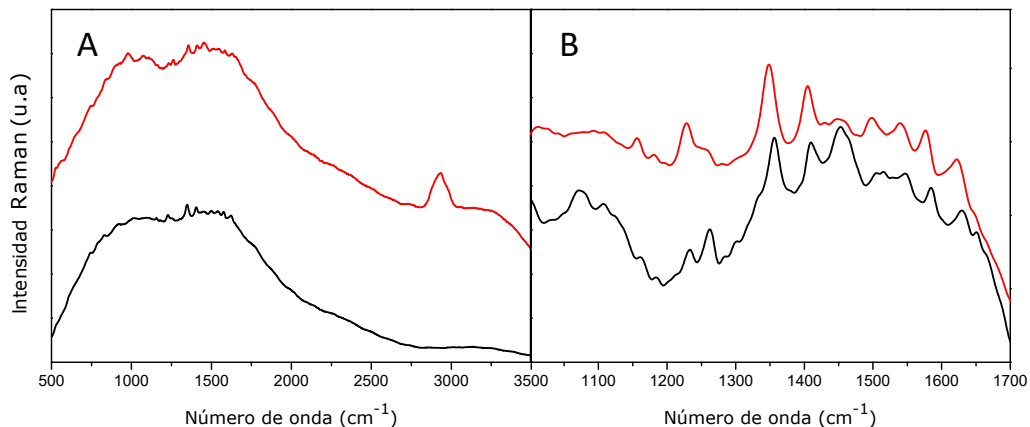


Fig. 1.2.6. (A) Espectro Raman de FAD/Au (—) y GOx/Au (—). (B) Ampliación del espectro entre 1000 y 1700 cm^{-1} .

1.2.2.4. Caracterización electroquímica

Se realizó también la caracterización electroquímica de las distintas etapas del desarrollo del biosensor mediante el estudio de su respuesta voltamperométrica en presencia de hidroximetil ferroceno, como se describe en el apartado 4.9 de materiales y métodos, para una ventana de potencial de -0.7 a $+0.7$ V. En la figura 1.2.7 se observa la respuesta redox típica del HMF a $+0.30$ V. Como ya se comentó en el apartado 1.1.2.3. de este capítulo, la respuesta del electrodo modificado con DNPs9 (—) presenta una mejora en la intensidad de ambos picos respecto al electrodo sin modificar (línea negra). En cambio, para el caso del biosensor GOx/DNPs9/Au (—) se observa que la intensidad de la corriente de los picos anódico y catódico del HMF disminuyen respecto a los del sistema DNPs9/Au. Esto es lo esperado ya que la presencia de la enzima adsorbida sobre las DNPs dificulta, en parte, la transferencia de electrones del HMF a la superficie del electrodo. Es interesante resaltar que en presencia de la enzima aparece un nuevo par redox a

-0.4 V, que adscribimos a la oxidación-reducción del FAD/FADH₂ de la enzima inmovilizada (ecuación 1.2.1).

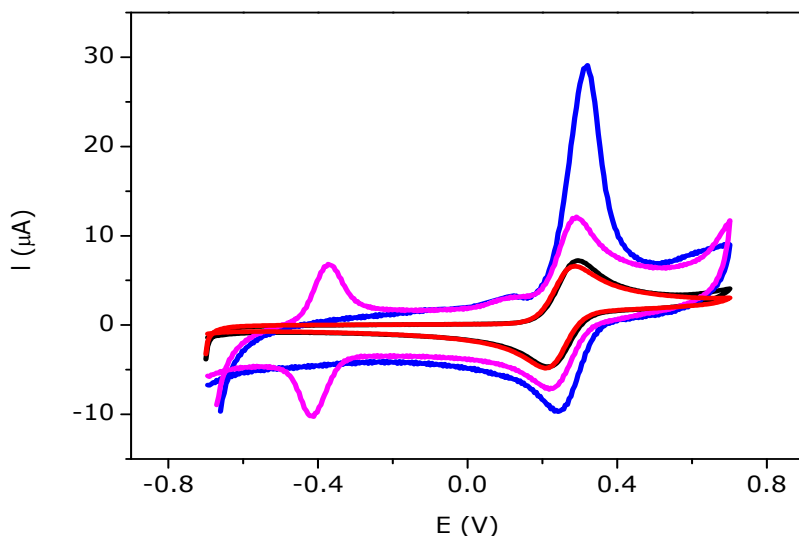


Fig. 1.2.7. Voltamperogramas cíclicos del electrodo de oro sin modificar (—), DNPs9/Au (—), GOx/DNPs9/Au (—) y GOx/Au (—), en presencia de HMF 1.0 mM pH 7.0. Velocidad de barrido: 100 mV s⁻¹.

Como se puede observar, este pico a -0.40 V solo aparece cuando el electrodo está modificado tanto con las nanopartículas como con la enzima, y no cuando sólo está la enzima inmovilizada sobre el electrodo (—). Esto indicaría que las DNPs promueven la transferencia electrónica entre la enzima y el electrodo, haciendo posible que el cofactor redox de esta sea oxidado o reducido en la superficie del mismo, lo cual concuerda con lo descrito en la bibliografía [Zhu J.T., 2007].

Para comprobar si el par redox obtenido a -0.40 V corresponde efectivamente al sistema FAD/FADH₂, se realizó el mismo experimento, pero inmovilizando la enzima LOx, que tiene el mismo cofactor [Rassaei, 2014]. Como se puede observar en la

figura 1.2.8, se obtiene el mismo resultado que para el caso de la GOx, el pico a -0.40 V aparece de nuevo y sólo en el caso del electrodo modificado con las DNPs9 y la LOx. Lo cual confirma que se debe a la oxidación/reducción del cofactor FAD presente en ambas enzimas, que se da sólo en el caso de tener el electrodo nanoestructurado con DNPs9, por el efecto promotor que éstas tienen.

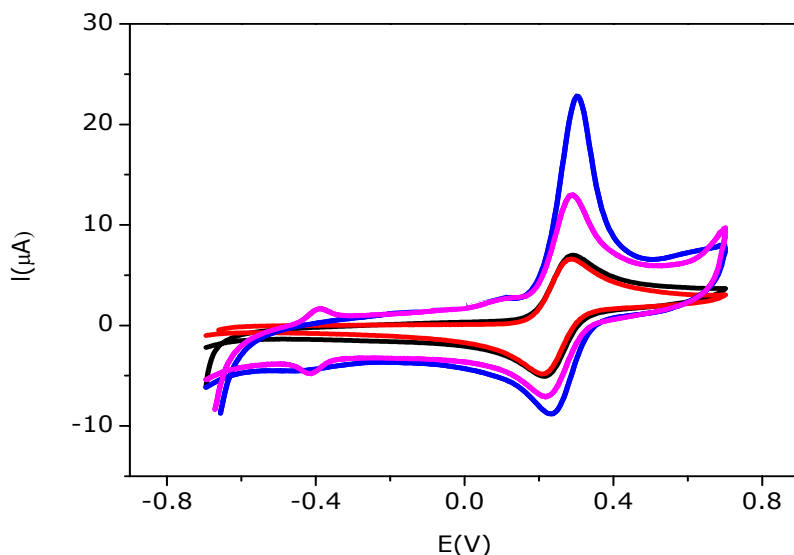


Fig. 1.2.8. Voltamperogramas cíclicos del electrodo de oro sin modificar (—), DNPs9/Au (—), LOx/DNPs9/Au (—) y LOx/Au (—), en presencia de HMF 1.0 mM pH 7.0. Velocidad de barrido: 100 mV s^{-1} .

1.2.3. Respuesta del biosensor de glucosa (GOx/DNPs9/Au)

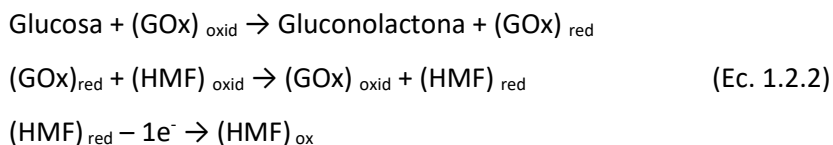
Una vez caracterizadas las distintas etapas del desarrollo del biosensor, se estudió su respuesta frente a la adición de glucosa, en presencia de HMF en disolución. La enzima GOx cataliza la oxidación de la glucosa a gluconolactona en presencia de oxígeno.



Cuando se emplea el oxígeno como aceptor de electrones, las estrategias que se utilizan para seguir la respuesta del biosensor se basan, o bien en monitorizar el consumo de O_2 o, en la determinación del H_2O_2 generado en la reacción enzimática, de acuerdo con el siguiente proceso [Eggins, 1996; Yang Q.L., 1998; Palmisano, 2000; Palmisano, 2001]:

La glucosa es oxidada al mismo tiempo que la enzima pasa a su forma reducida, entonces, el oxígeno que actúa como aceptor de electrones, regenera la enzima a su forma oxidada generando H_2O_2 . Este H_2O_2 generado se oxida sobre el electrodo a oxígeno y da lugar a la señal electroquímica [Perdomo, 1999].

Sin embargo, la determinación electroquímica de peróxido de hidrógeno se realiza a potenciales positivos altos, lo que puede provocar problemas de interferentes con sustancias que se encuentran frecuentemente en muestras reales como ácido cítrico, ácido tartárico, ácido úrico, etc. [Nikolaus, 2008]. Para evitar estos problemas, una de las estrategias más empleadas es la de sustituir el aceptor natural de electrones de la reacción enzimática, el oxígeno, por un mediador redox. Un mediador redox es una especie electroactiva que actúa como aceptor de electrones además de favorecer la transferencia de carga entre la superficie del electrodo y el centro redox de la enzima [Antiochia, 1997]. Por eso, como se ha comentado anteriormente, en este caso se empleó HMF como aceptor de electrones, por lo que el proceso catalítico se produce de la siguiente forma:



La enzima glucosa oxidasa inmovilizada sobre el electrodo oxida la glucosa a gluconolactona en presencia del hidroximetil ferroceno, de forma que, en cada ciclo catalítico el HMF reducido se transforma sobre el electrodo en HMF oxidado y, por tanto, el potencial redox del sistema $\text{HMF}_{\text{red}}/\text{HMF}_{\text{oxid}}$ es el potencial empleado para determinar la respuesta del biosensor. Posteriormente, la enzima se regenera utilizando el mediador oxidado como aceptor de electrones (figura 1.2.9).

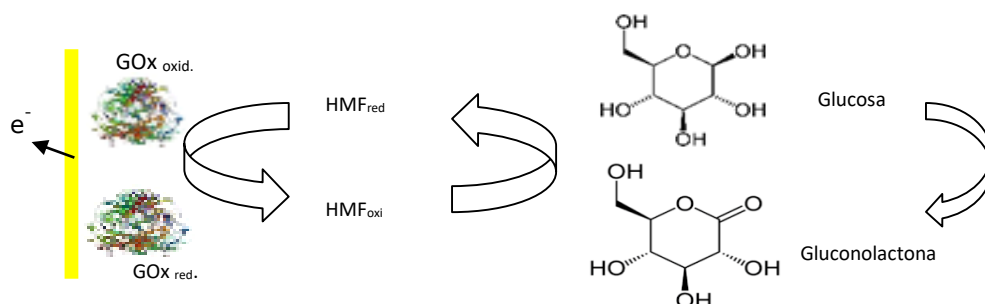


Fig. 1.2.9. Esquema del proceso catalítico de oxidación de la glucosa a gluconolactona catalizado por GOx y empleando HMF como aceptor de electrones.

En la figura 1.2.10 se muestran los voltamperogramas cíclicos obtenidos en ausencia (—) y en presencia de 5.0 mM de glucosa (—). Como se puede ver, en ausencia de glucosa se observa la respuesta redox típica del proceso de óxido-reducción del hidroximetil ferroceno $\text{HMF}(\text{FeII})/\text{HMF}(\text{FeIII})$ en medio acuoso a +0.30 V. Sin embargo, en presencia de glucosa se produce un aumento en la corriente de pico anódica a la vez que una disminución en la corriente catódica, comportamiento característico de un proceso catalítico. La intensidad de la corriente catalítica es proporcional a la concentración de glucosa, por lo que puede ser empleada como señal analítica para la determinación de la concentración de glucosa.

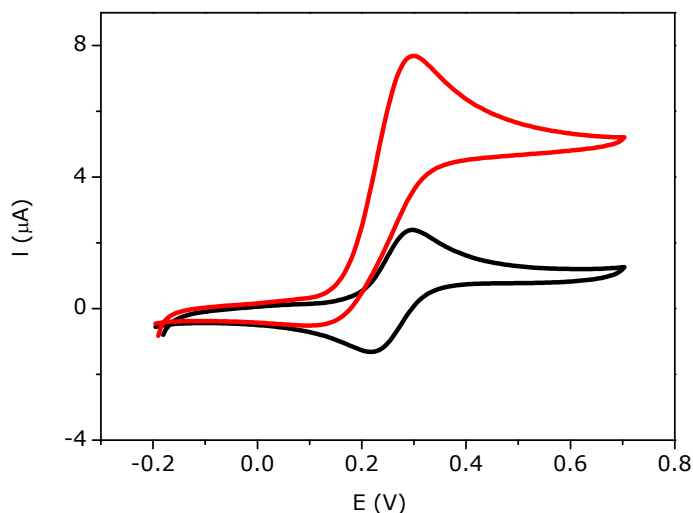


Fig. 1.2.10. Voltamperograma cíclico del biosensor de glucosa basado en un electrodo de oro nanoestructurado con DNP9 (GOx/DNP9/Au), en una disolución 0.1 M de tampón acético/acetato pH 4.5 que contiene HMF 1.0 mM, en ausencia (—) y en presencia de 5.0 mM de glucosa (—). Velocidad de barrido: 10 mV s^{-1} .

Para elucidar el papel de las DNP9 en el proceso catalítico se obtuvo el voltamperograma cíclico de un electrodo de oro modificado con GOx, de acuerdo con la metodología descrita en la parte experimental, bajo las mismas condiciones. En este caso, como se puede observar en la figura 1.2.11, no se observó respuesta catalítica. La presencia de las DNP9 además de aumentar el área superficial relativa, pueden contribuir a una mejor distribución de la enzima sobre la superficie y así favorecer la transferencia electrónica entre la enzima y el mediador, mejorando así la respuesta catalítica en presencia de glucosa.

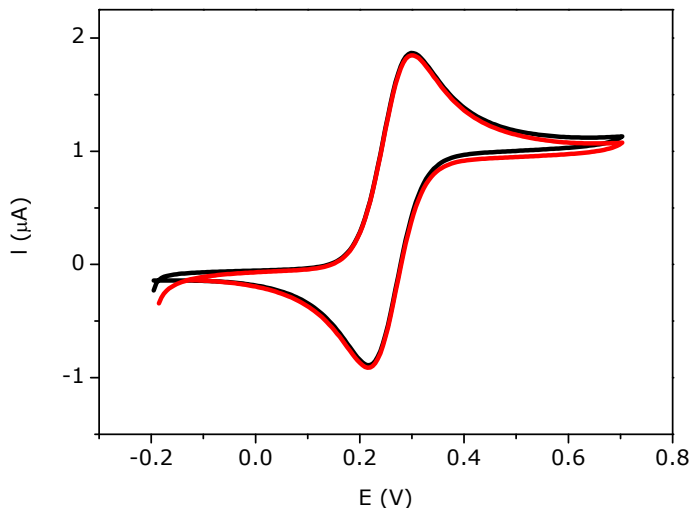


Fig. 1.2.11. Voltamperograma cíclico de un biosensor de glucosa construido sobre un electrodo de oro (GOx/Au), en disolución 0.1 M de tampón acético/acetato pH 4.5 que contiene HMF 1.0 mM, en ausencia (—) y en presencia de 5.0 mM de glucosa (—). Velocidad de barrido: 10 mV s^{-1} .

1.2.3.1. Obtención de la curva de calibrado

Una vez comprobado el funcionamiento del biosensor, se procedió a estudiar la linealidad de la respuesta en función de la concentración de glucosa en disolución. En la figura 1.2.12 se puede ver la respuesta voltamperométrica del biosensor en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de glucosa.

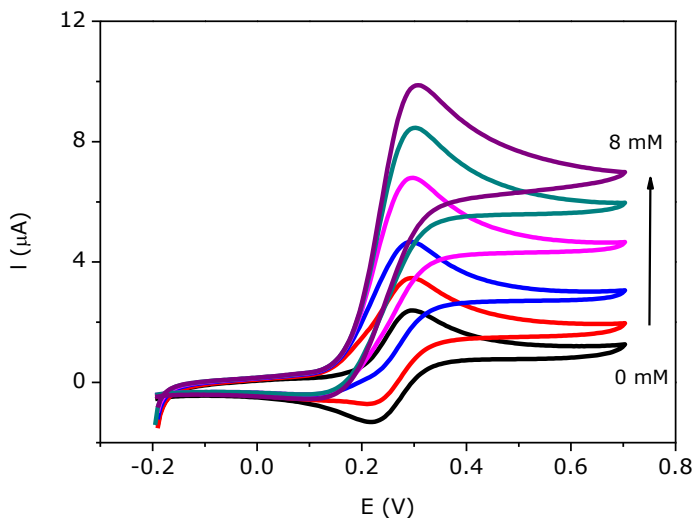


Fig. 1.2.12. Voltamperogramas cíclicos obtenidos para el biosensor GOx/DNPs9/Au en una disolución 0.1 M de tampón acético/acetato pH 4.5 que contiene HMF 1.0 mM, en ausencia y en presencia de 1.0 mM, 2.0 mM, 4.0 mM, 6.0 mM y 8.0 mM de glucosa. Velocidad de barrido: 10 mV s^{-1} .

Se obtuvo la correspondiente curva de calibrado (figura 1.2.13) mediante la representación de la corriente catalítica, calculada como la diferencia entre el valor de la corriente máxima medida a $+0.30 \text{ V}$, en presencia y en ausencia de glucosa, para cada adición de glucosa, frente a concentraciones crecientes de glucosa. Estas medidas se llevaron a cabo agitando después de cada adición de sustrato y manteniendo en reposo durante la medida, para asegurar el control difusional del analito a la superficie del electrodo. Además, como etapa previa, igual que en los casos anteriores, se procedió a la desoxigenación de la disolución mediante N_2 , manteniendo alejado de la disolución el foco de N_2 durante la medida para evitar procesos de convección.

En el inserto de la figura 1.2.13 se presenta el intervalo lineal de la curva, del que posteriormente se determinarán las propiedades analíticas del biosensor. Como se puede observar, la curva de calibrado sigue el modelo de Michaelis-Menten y, a

partir de una determinada concentración de glucosa, se alcanza una intensidad constante, como se espera en una reacción enzimática. Esto indica que la respuesta del biosensor está controlada por la cinética enzimática y la intensidad de corriente será proporcional a la concentración de sustrato enzimático.

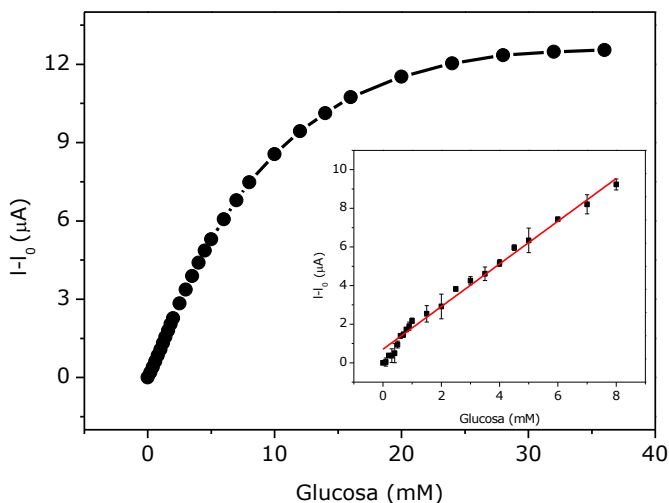


Fig. 1.2.13. Curva de calibrado para GOx/DNPs9/Au obtenida a partir de la corriente máxima, medida a +0.30 V, menos I_0 de los voltamperogramas obtenidos en tampón acético/acetato 0.1 M pH=4.5 conteniendo HMF 1.0 mM, en presencia de cantidades crecientes de sustrato. Velocidad de barrido: 10 mV s⁻¹. Inserto: intervalo lineal.

1.2.3.2. Determinación de las propiedades analíticas del biosensor de glucosa (GOx/DNPs9/Au)

Se determinaron las propiedades analíticas del biosensor GOx/DNPs9/Au a partir del intervalo lineal de la curva de calibrado (inserto figura 1.2.13). Los datos, obtenidos de la media de tres réplicas, se recogen en la siguiente tabla:

Tabla 1.2.1. Propiedades analíticas del biosensor GOx/DNPs9/Au.

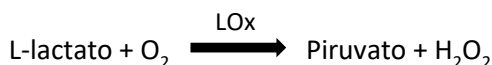
	GOx/DNPs9/Au
<i>Respuesta lineal</i>	Hasta 8.0 mM
<i>Sensibilidad ($\mu\text{A mM}^{-1}$)</i>	0.98 ± 0.02
<i>Límite de detección (μM)</i>	61.6
<i>Límite de cuantificación (μM)</i>	205
<i>Reproducibilidad (R.S.D.%)</i>	4
<i>Estabilidad (%) (15 días)</i>	50

Se obtuvo una respuesta lineal hasta una concentración de 8.0 mM. La sensibilidad, calculada a partir de la pendiente de la recta, es de $0.98 \mu\text{A mM}^{-1}$. El límite de detección se calculó a partir de la media de tres veces la desviación estándar del blanco dividido por la sensibilidad y el límite de determinación se calculó a partir de 10 veces la desviación estándar del blanco (calculada de diez medidas del blanco) dividido por la sensibilidad, obteniéndose los valores de $61.6 \mu\text{M}$ y $205 \mu\text{M}$ respectivamente. La reproducibilidad se evaluó comparando las respuestas analíticas obtenidas frente a la adición de 5 mM de glucosa utilizando tres biosensores diferentes, obteniendo un valor, expresado en porcentaje de desviación estándar relativa (R.S.D.%), de 4%. La estabilidad se evaluó teniendo en cuenta el porcentaje de señal analítica que se mantiene después de 15 días, midiendo la respuesta en presencia de 5 mM de glucosa. Transcurrido ese tiempo, retienen un 50% de su respuesta inicial.

El biosensor desarrollado presenta unos parámetros analíticos comparables con los reportados en la bibliografía para otros biosensores de glucosa que también emplean nanomateriales de carbono, e incluso mejorando los límites de detección: $180 \mu\text{M}$ [Shan, 2010], $1300 \mu\text{M}$ [Chaturvedi, 2014], $160 \mu\text{M}$ [Palanisamy, 2014], $250 \mu\text{M}$ [Wang Y., 2014].

1.2.4. Respuesta del biosensor de lactato (LOx/DNPs9/Au)

Una vez comprobada la buena respuesta obtenida por el biosensor de glucosa desarrollado nanoestructurando el electrodo de oro con las DNPs9, se desarrolló un biosensor de lactato de manera similar a la descrita para el biosensor de glucosa, pero inmovilizando en este caso la enzima LOx como elemento de reconocimiento. Para ello se modificó un electrodo de oro con 5 μL de una suspensión 1 mg mL^{-1} de DNPs9 y, posteriormente, se inmovilizó la enzima por adsorción directa. La enzima lactato oxidasa actúa oxidando el L-lactato a piruvato y generando peróxido de hidrógeno.



Al igual que el caso anterior, se empleó HMF como mediador en disolución, por tanto, la respuesta del biosensor está basada en la oxidación de L-lactato a piruvato catalizado por LOx y en presencia de HMF, siguiendo el esquema de la figura 1.2.14.

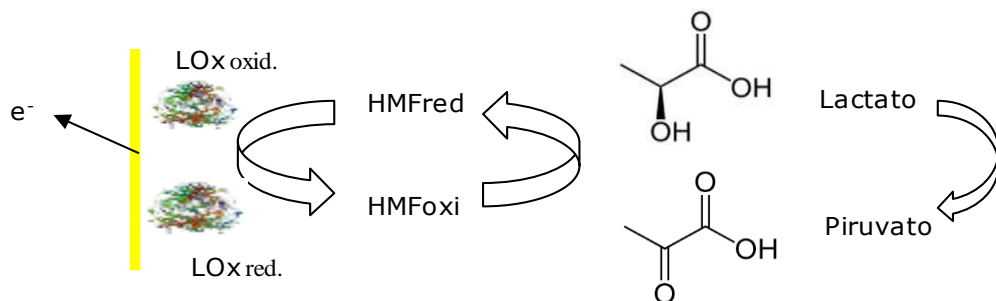
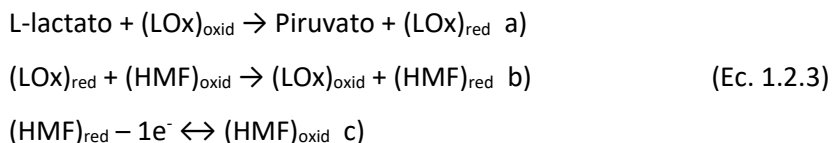


Fig. 1.2.14. Esquema del proceso catalítico de oxidación del L-lactato a piruvato catalizado por LOx y empleando HMF como aceptor de electrones.

El mecanismo es el mismo que en el caso de la enzima glucosa oxidasa. La enzima LOx oxida el L-lactato a piruvato en presencia del hidroximetil ferroceno. El HMF

reducido se transforma, sobre el electrodo, en HMF oxidado y, posteriormente, la enzima se regenera utilizando el mediador oxidado como aceptor de electrones.



En primer lugar, se estudió la respuesta del biosensor LOx/DNPs9/Au frente a la adición de lactato. Para ello se introdujo el biosensor en una disolución de tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 que contiene HMF 1.0 mM, y se registró el voltamperograma cíclico entre -0.2 V y +0.7 V a una velocidad de barrido de 10 mV s⁻¹. En la figura 1.2.15 se presentan los voltamperogramas cíclicos obtenidos en ausencia (—) y en presencia de 0.5 mM de lactato (—). Se observa la respuesta redox típica del proceso HMF (FeII)/HMF (FeIII) a +0.30 V y, en presencia de lactato se produce una corriente catalítica.

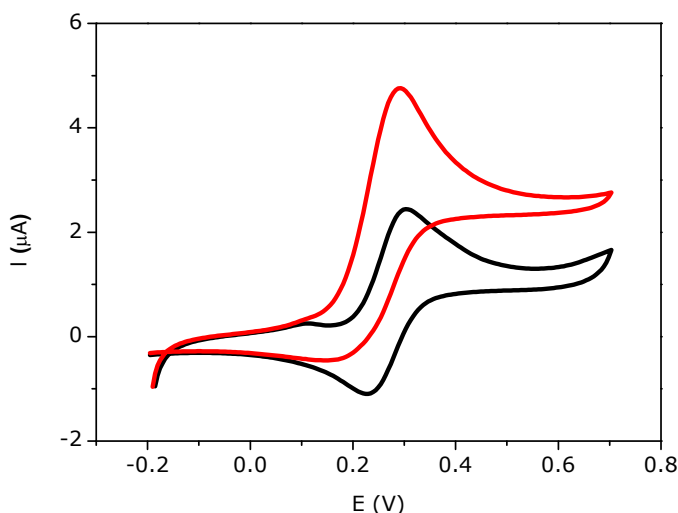


Fig. 1.2.15. Voltamperogramas cíclicos obtenidos para el biosensor LOx/DNPs9/Au en una disolución 0.1 M de tampón fosfato pH 7.0 que contiene HMF 1.0 mM, en ausencia (—) y en presencia de 0.5 mM de lactato (—). Velocidad de barrido: 10 mV s⁻¹.

1.2.4.1. Obtención de la curva de calibrado

De los voltamperogramas cíclicos obtenidos para concentraciones crecientes de lactato (figura 1.2.16) se obtuvo la curva de calibrado que se presenta en la figura 1.2.17, donde cada punto de la curva representa la corriente catalítica obtenida después de la adición de una determinada concentración de lactato, siendo esta la diferencia entre el valor de la corriente máxima en presencia y en ausencia de lactato, medido a +0.30 V. Las medidas se llevaron a cabo de la misma forma que en los casos anteriores, agitando después de cada adición de sustrato y permaneciendo en reposo durante la medida. En el inserto aparece el intervalo lineal de la curva del que posteriormente se determinarán las propiedades analíticas del biosensor.

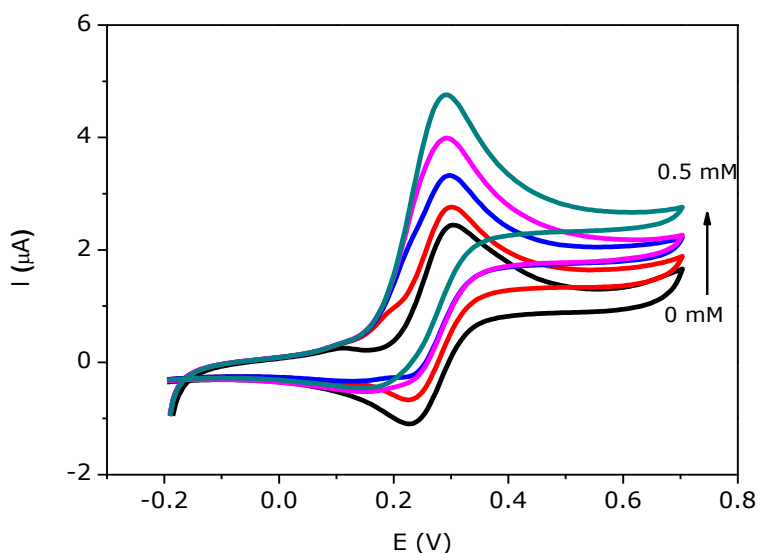


Fig. 1.2.16. Voltamperogramas cíclicos obtenidos para el biosensor LOx/DNPs9/Au en una disolución 0.1 M de tampón fosfato pH 7.0 que contiene HMF 1.0 mM, en ausencia y en presencia de 0.10 mM, 0.25 mM, 0.40 mM y 0.50 mM de lactato. Velocidad de barrido: 10 mV s^{-1} .

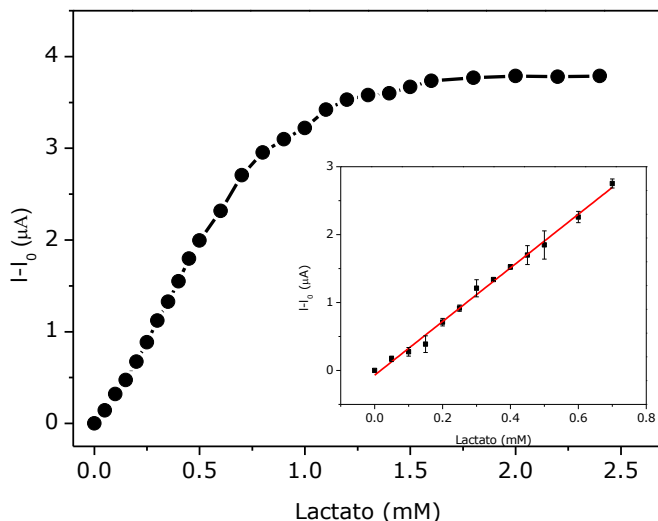


Fig. 1.2.17. Curva de calibrado para LOx/DNPs9/Au obtenida a partir de la corriente máxima menos I_0 de los voltamperogramas obtenidos en tampón fosfato 0.1 M pH=7.0 conteniendo HMF 1.0 mM en presencia de cantidades crecientes de sustrato. Velocidad de barrido: 10 mV s^{-1} . Inserto: intervalo lineal.

1.2.4.2. Determinación de las propiedades analíticas del biosensor de lactato (LOx/DNPs9/Au)

Las propiedades analíticas del biosensor, se obtuvieron a partir del intervalo lineal de la curva de calibrado (inserto figura 1.2.17) y se resumen en la tabla 1.2.2.

Se obtuvo un intervalo lineal hasta 0.7 mM. La sensibilidad, calculada a partir de la pendiente de la gráfica, es de $4.0 \mu\text{A mM}^{-1}$. El límite de detección, calculado como tres veces la desviación estándar del blanco (calculada de diez medidas del blanco) entre la sensibilidad, fue de $15 \mu\text{M}$ y el límite de cuantificación, calculado como diez veces la desviación del blanco entre la sensibilidad, fue de $50 \mu\text{M}$. La reproducibilidad se calculó empleando 3 biosensores diferentes obteniéndose un valor de RSD de 6%. También se evaluó la estabilidad de almacenamiento,

concluyendo que el biosensor mantiene el 50% de su respuesta inicial tras 15 días. Estos resultados se obtuvieron de la media de tres réplicas.

Tabla 1.2.2. Propiedades analíticas del biosensor LOx/DNPs9/Au.

	LOx/DNPs9/Au
<i>Respuesta lineal</i>	Hasta 0.7 mM
<i>Sensibilidad ($\mu\text{A mM}^{-1}$)</i>	4.00 ± 0.02
<i>Límite de detección (μM)</i>	15
<i>Límite de cuantificación (μM)</i>	50
<i>Reproducibilidad (R.S.D.%)</i>	6
<i>Estabilidad (%) (15 días)</i>	50

Los resultados obtenidos son semejantes a los descritos en la bibliografía para otros biosensores de lactato (tabla 1.2.3). Como se puede ver, aunque el biosensor modificado con MPTS y nanopartículas de oro [Parra-Alfambra, 2011] y el modificado con grafeno oxidado [Casero, 2013] presentan unos mejores límites de detección, el biosensor desarrollado en este trabajo presenta un intervalo lineal más amplio.

Tabla 1.2.3. Comparación de los parámetros analíticos de biosensores de lactato.

Electrodo	Intervalo lineal (mM)	Sensibilidad ($\mu\text{A mM}^{-1}$)	LD (μM)	Reproducibilidad RSD (%)	Referencia
LOx/Au	Hasta 0.30	0.77	10	8	[Parra-Alfambra, 2006a]
LOx/DTSP/Au	Hasta 0.20	0.69	40	8	[Parra-Alfambra, 2006a]
LOx/AuNPs/MPTS/Au	Hasta 0.25	3.4	4.0	5	[Parra-Alfambra, 2011]
LOx/GO/GC	Hasta 0.58	6.5	5.5	3	[Casero, 2013]
LOx/ERG/GC	Hasta 1.60	2.6	16	7	[Casero, 2013]

Abreviaturas: Au: oro, LOx: lactato oxidasa, MPTS: 3-mercaptopropiltrimetoxisilano, DTSP: Ditiobis (N-succinimidil propionato), AuNPs: nanopartículas de oro, GC: electrodo de carbón vítreo, GO: grafeno oxidado, ERG: grafeno reducido electroquímicamente.

Además, en concreto los límites de detección obtenidos con el biosensor LOx/DNPs9/Au son comparables también con otros métodos comerciales que se emplean para la determinación de lactato, como son los kits enzimáticos (tabla 1.2.4).

Tabla 1.2.4. Comparación del límite de detección (en mg L^{-1}) obtenido para el biosensor LOx/DNPs9/Au con respecto a otros métodos de determinación de lactato (kits enzimáticos comerciales).

Métodos para la determinación de lactato	LD (mg L^{-1})
Biosensor LOx/DNPs9/Au	1.4
Kit enzimático Biosystems	20
Kit enzimático Boehringer Mannheim	0.3
Kit enzimático Megazyme	0.21

1.2.4.3. Respuesta del biosensor de lactato (LOx/DNPs9/Au) obtenida mediante cronoamperometría

La técnica más empleada para las determinaciones analíticas es la cronoamperometría, mientras que la voltamperometría cíclica es más habitual para la caracterización. Por esto, se obtuvo también la respuesta del biosensor LOx/DNPs9/Au mediante cronoamperometría de un solo pulso, frente a cantidades crecientes de lactato, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.9 de materiales y métodos. Se aplicó un pulso de potencial +0.35 V durante 60 segundos y se monitorizó la variación de corriente en este intervalo de tiempo (figura 1.2.18).

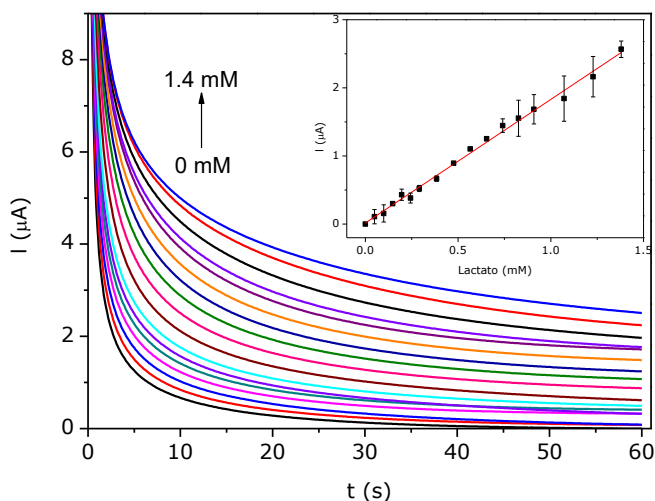


Fig. 1.2.18. Cronoamperogramas obtenidos para el biosensor LOx/DNPs9/Au en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0, conteniendo HMF 1.0 mM, en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de lactato. Inserto: Corriente en el estado estacionario a 50 segundos frente a concentración de lactato.

En el inserto de la figura 1.2.18 se presenta la recta obtenida al representar la corriente en el estado estacionario, medida a los 50 segundos, frente a la concentración de lactato, a partir de la cual se calcularon los parámetros analíticos

del biosensor, recogidos en la tabla 1.2.5. Como se puede observar, si comparamos estos parámetros con los obtenidos mediante voltamperometría cíclica se obtuvo un intervalo lineal más amplio pero, sin embargo, no se obtuvieron mejores límites de detección y cuantificación. Por tanto, en este caso, la voltamperometría cíclica es una técnica adecuada para la monitorización de la respuesta del biosensor.

Tabla 1.2.5. Propiedades analíticas del biosensor LOx/DNPs9/Au obtenidos mediante cronoamperometría.

	LOx/DNPs9/Au
<i>Respuesta lineal</i>	Hasta 1.4 mM
<i>Sensibilidad ($\mu\text{A mM}^{-1}$)</i>	1.81 ± 0.14
<i>Límite de detección (μM)</i>	25
<i>Límite de cuantificación (μM)</i>	83

1.2.5. Respuesta de los biosensores de glucosa (GOx/DNPs9/Au) y lactato (LOx/DNPs9/Au) obtenidas a velocidad de barrido 100 mV s⁻¹

Aunque, normalmente la velocidad de barrido a la que se observan las respuestas electrocatalíticas es baja, ya que debe dar tiempo a que la reacción química tenga lugar, para reacciones enzimáticas con catálisis rápidas se puede observar su respuesta a velocidades de barrido mayores. Por ello, se quiso estudiar el comportamiento de los biosensores desarrollados a velocidades más altas, en concreto a 100 mV s⁻¹.

Se obtuvieron las respuestas electrocatalíticas de ambos biosensores, GOx/DNPs9/Au y LOx/DNPs9/Au, frente a adiciones crecientes de glucosa y lactato respectivamente, en las mismas condiciones en las que se obtuvieron las curvas de calibrado a 10 mV s⁻¹. Como se puede observar en la figura 1.2.19, ambos presentan respuesta catalítica frente a la adición de sustrato.

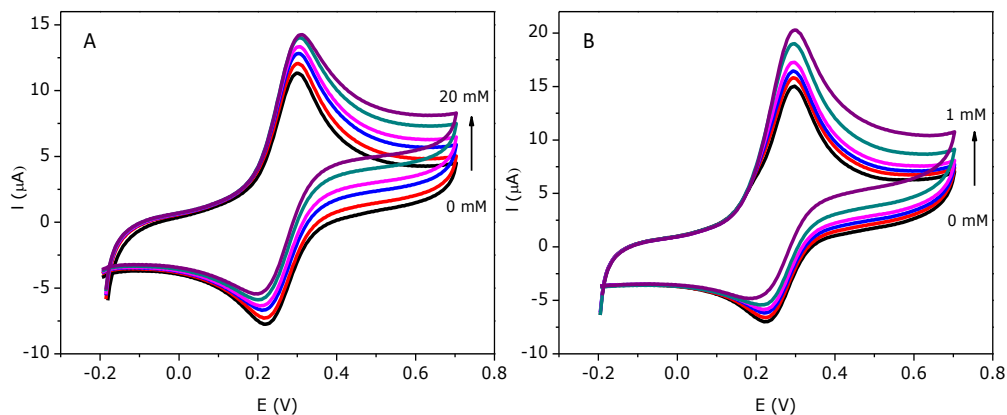


Fig. 1.2.19. Voltamperogramas cíclicos obtenidos para (A) GOx/DNPs9/Au en una disolución 0.1 M de tampón acético/acetato pH 4.5 conteniendo HMF 1.0 mM, en ausencia y en presencia de 1.0, 3.0, 5.0, 10 y 20 mM de glucosa y para (B) LOx/DNPs9/Au en una disolución 0.1 M de tampón fosfato pH 7.0 conteniendo HMF 1.0 mM, en ausencia y en presencia de 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 y 1.0 mM de lactato. Velocidad de barrido: 100 mV s^{-1} .

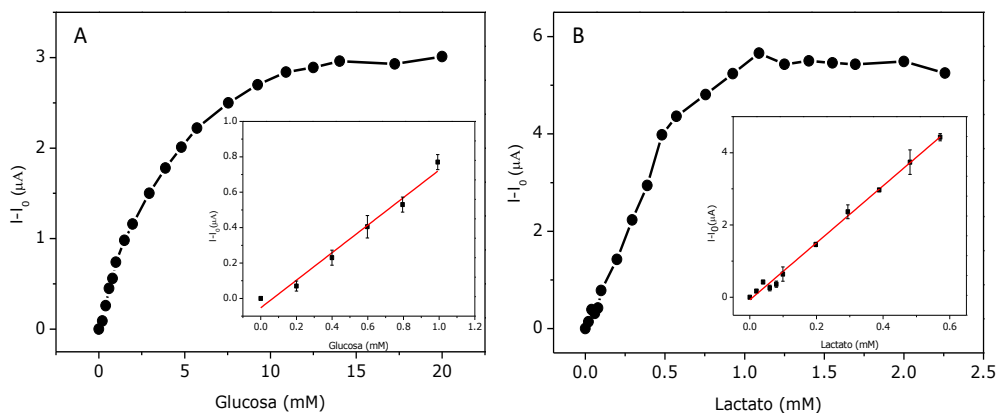


Fig. 1.2.20. Curvas de calibrado obtenidas a partir de la corriente electrocatalítica, medida a $+0.30 \text{ V}$, menos I_0 de los voltamperogramas obtenidos para los biosensores (A) GOx/DNPs9/Au, en tampón acético/acetato 0.1 M pH=4.5 conteniendo HMF 1.0 mM en presencia de cantidades crecientes de sustrato y (B) LOx/DNPs9/Au, en tampón fosfato 0.1 M pH=7.0 conteniendo HMF 1.0 mM en presencia de cantidades crecientes de sustrato. Velocidad de barrido: 100 mV s^{-1} . En los insertos de ambas figuras se presenta el intervalo lineal de respuesta.

Se obtuvieron las curvas de calibrado para cada biosensor (figura 1.2.20). Del intervalo lineal de cada una de ellas se obtuvieron los parámetros analíticos correspondientes, presentados en la tabla 1.2.6, siendo estos la media de tres réplicas.

Tabla 1.2.6. Propiedades analíticas de los biosensores GOx/DNPs9/Au y LOx/DNPs9/Au medidas a 100 mV s⁻¹.

	GOx/DNPs9/Au 100 mV s⁻¹	LOx/DNPs9/Au 100 mV s⁻¹
Respuesta lineal	Hasta 1.0 mM	Hasta 0.6 mM
Sensibilidad (μA mM⁻¹)	0.76 ± 0.02	9.3 ± 0.1
Límite de detección (μM)	94	37
Límite de cuantificación (μM)	314	125

La sensibilidad se calculó, para ambos biosensores, a partir de la pendiente de la recta, alcanzando un valor de 0.76 μA mM⁻¹ para GOx/DNPs9/Au y de 9.3 μA mM⁻¹ para LOx/DNPs9/Au. Los límites de detección y de cuantificación se calcularon a partir de la media de tres y diez veces la desviación estándar del blanco dividido por la sensibilidad, tomando la desviación estándar de 10 medidas del blanco. Los límites de detección y cuantificación para GOx/DNPs9/Au fueron de 94 μM y 314 μM, y los obtenidos para el biosensor LOx/DNPs9/Au fueron de 37 y 125 μM, respectivamente. Los intervalos lineales obtenidos fueron de 1.0 mM y 0.6 mM. Estos resultados no mejoran los parámetros obtenidos midiendo las respuestas de ambos biosensores a una velocidad de barrido de 10 mV s⁻¹, sin embargo, pone de manifiesto que las catálisis que tienen lugar son suficientemente rápidas como para ser monitorizadas a velocidades de barrido elevadas, con el ahorro en tiempo de análisis que conlleva.

1.2.6. Cálculo de los parámetros y constantes de interés del biosensor de lactato (LOx/DNPs9/Au)

1.2.6.1. Determinación de la constante catalítica para lactato (k)

Se calculó la constante catalítica (k) de respuesta del biosensor desarrollado LOx/DNPs9/Au empleando el método Galus [Galus, 1991], como se describe en el apartado 5.1 de materiales y métodos, mediante cronoamperometría medida a +0.35 V. La figura 1.2.21 muestra las rectas obtenidas de la representación de la I_{cat}/I_{dif} frente a la raíz cuadrada del tiempo de medida a distintas concentraciones de lactato. Al representar las pendientes de las rectas obtenidas frente a la raíz cuadrada de la concentración de lactato, se obtiene una nueva recta (Inserto figura 1.2.21). De la pendiente de dicha recta se obtiene el valor de la constante catalítica, siendo en este caso de $(1.53 \pm 0.4) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, valor muy cercano al reportado para la enzima libre ($9 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [Lockridge, 1972], lo que demuestra las buenas propiedades electrocatalíticas que presenta el biosensor desarrollado.

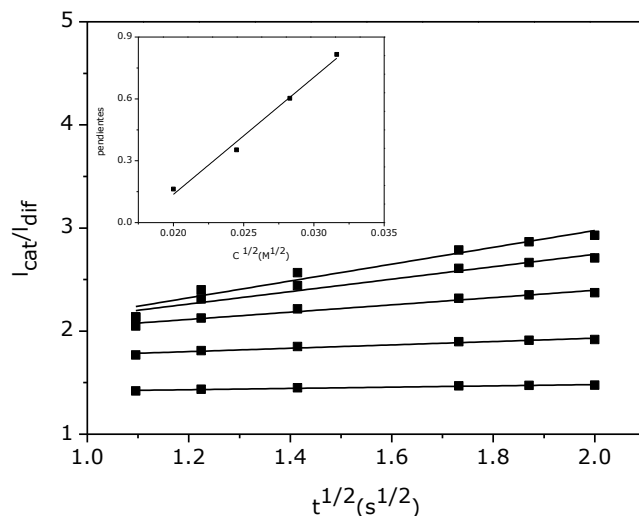


Fig. 1.2.21. Representación de I_{cat}/I_{dif} frente a $t^{1/2}$ para lactato sobre LOx/DNPs9/Au. Inserto: Representación de las pendientes de las rectas frente a la raíz cuadrada de la concentración.

A modo de comparación, se calculó también la constante catalítica del biosensor preparado con el electrodo de oro sin nanoestructurar, modificado sólo con la enzima, por adsorción directa, (LOx/Au). Las medidas se realizaron siguiendo el mismo protocolo que en el caso anterior. En la figura 1.2.22 se recogen las rectas obtenidas. De la pendiente de la recta (inserto figura 1.2.22) se obtiene un valor de la constante catalítica de $20 \pm 2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Este resultado es dos órdenes de magnitud menor que la constante catalítica de la enzima libre [Lockridge, 1972], lo que es de esperar ya que el proceso de inmovilización de la enzima sobre el electrodo puede influir en su conformación y, por tanto, en su actividad catalítica.

Además, el valor obtenido es aproximadamente 100 veces inferior al calculado para el electrodo nanoestructurado con DNPs9 y confirma que el biosensor LOx/DNPs9/Au mejora las propiedades electrocatalíticas para la oxidación de lactato respecto al biosensor no nanoestructurado, LOx/Au.

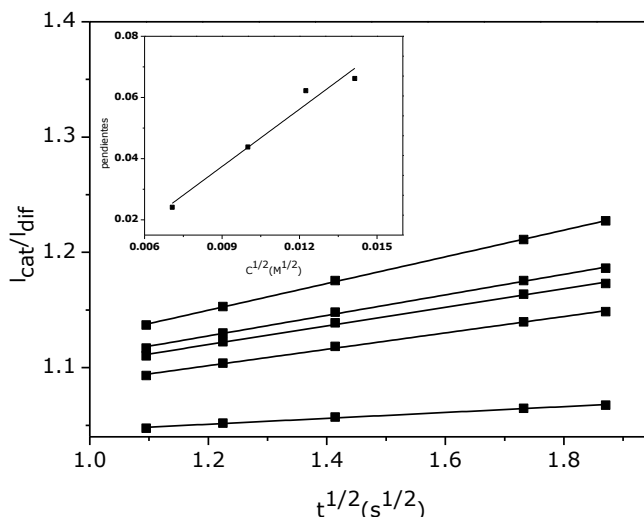


Fig. 1.2.22. Representación de I_{cat}/I_{dif} frente a $t^{1/2}$ para lactato sobre LOx/Au. Inserto: Representación de las pendientes de las rectas frente a la raíz cuadrada de la concentración.

1.2.6.2. Cálculo de los parámetros cinéticos del biosensor de lactato (LOx/DNPs9/Au)

La respuesta del biosensor de lactato se ajusta al modelo cinético de Michaelis-Menten [Johnson, 2011], que postula que, siempre que la concentración de enzima permanezca constante, la velocidad de la reacción enzimática se puede calcular mediante la siguiente ecuación:

$$V = \frac{V_{max}[S]}{(K_M + [S])} \quad (\text{Ec. 1.2.4})$$

Las constantes de la cinética enzimática entre la enzima oxidada y el sustrato, L-lactato, para dar piruvato y la enzima reducida (ecuación 1.2.3.a) están englobadas en la constante aparente de Michaelis (K_M), siendo el valor de esta constante inversamente proporcional a la afinidad de la enzima por el sustrato. Por otro lado,

la velocidad máxima (V_{\max}) refleja la velocidad cuando todo el sustrato se ha unido a la enzima, alcanzándose condiciones de saturación.

En la figura 1.2.17 se observa que, a bajas concentraciones de lactato, el biosensor responde linealmente con la concentración, la cinética es de primer orden, en este tramo se produce la formación del complejo enzima-sustrato. Al ir aumentando la concentración de lactato se pierde la linealidad, hasta que se alcanza la respuesta máxima del biosensor, cuando la enzima está saturada, y no hay aumento de intensidad al aumentar la concentración de sustrato. En este punto se alcanza una cinética de orden cero.

El coeficiente de Hill, de acuerdo con la ecuación 1.2.5, permite evaluar si el comportamiento cinético se ajusta al modelo de Michaelis-Menten, de manera que el parámetro X de la ecuación actúa como indicador de la desviación respecto al modelo michaeliano [Iwuoha, 1997]. Cuanto más se acerque el valor de X a la unidad más se acercará la cinética al modelo michaeliano.

$$\text{Log} \left(\left(\frac{i_{\max}}{i} \right) - 1 \right) = \log K_M - X \log [\text{lactato}] \quad (\text{Ec. 1.2.5})$$

En la figura 1.2.23 se representa el $\log [(i_{\max}/i)-1]$ vs. $\log [\text{lactato}]$, de cuya pendiente, cambiada de signo se obtiene el coeficiente de Hill. Se obtiene un valor de $X = 1.1918$, muy cercano a la unidad, por tanto, se corrobora que se ajusta al modelo de Michaelis-Menten, y la respuesta del biosensor está controlada por la cinética enzimática.

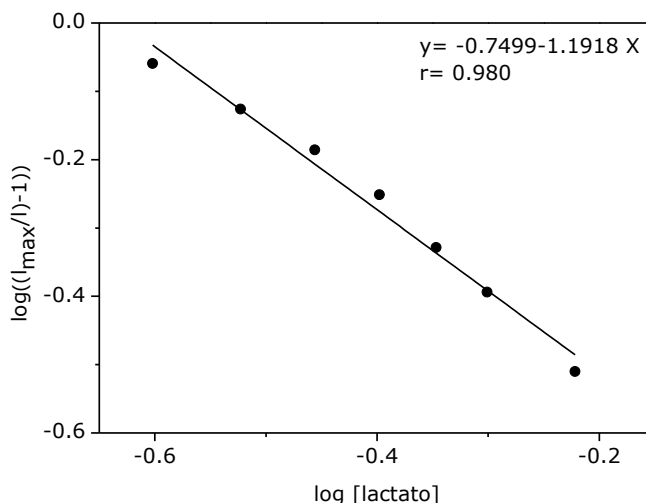


Fig. 1.2.23. Representación de la ecuación de Hill para el biosensor LOx/DNPs9/Au.

Una vez comprobado que se ajusta al modelo de Michaelis-Menten, se llevó a cabo el cálculo de los parámetros característicos, K_M e V_{max} a partir de la representación de Lineweaver-Burk [Lineweaver, 1934], haciendo uso de la ecuación:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (\text{Ec. 1.2.6})$$

Representando la inversa de la intensidad de corriente normalizada frente a la inversa de la concentración de lactato obtenemos una línea recta (figura 1.2.24). La inversa de la velocidad máxima ($1/V_{max}$) la obtenemos del corte con el eje de ordenadas, mientras que, el punto de corte con el eje de abscisas representa la inversa de la constante de Michaelis-Menten cambiada de signo ($-1/K_M$).

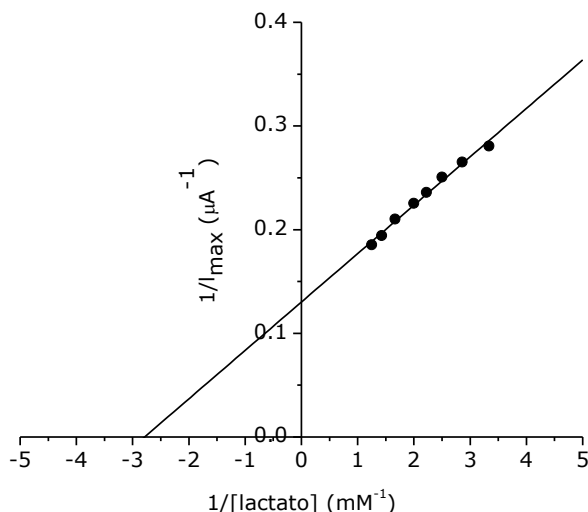


Fig. 1.2.24. Representación de Lineweaver-Burk del biosensor de lactato LOx/DNPs9/Au.

De esta representación se obtuvieron unos valores de K_M y V_{max} de 0.36 mM y 7.68 μA , respectivamente. El valor obtenido de K_M es comparable, e incluso menor, que los estimados para otros biosensores de lactato basados en LOx encontrados en la bibliografía: 0.88 mM [Iwuoha, 1999], 0.22 mM [Zanini, 2010], y muy cercano al de la enzima libre 0.23 mM [Suman, 2005], quedando así demostrada la buena actividad que presenta la LOx frente a L-lactato al inmovilizarla sobre el electrodo DNPs9/Au.

1.2.7. Aplicación del biosensor LOx/DNPs9/Au a la determinación de lactato en muestras reales

1.2.7.1. Estudio de interferentes

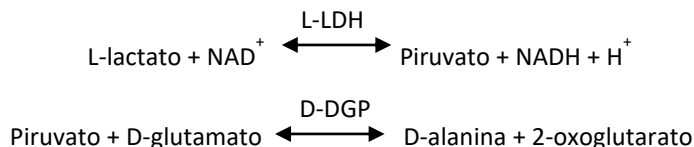
Con el objetivo de poder emplear el biosensor desarrollado para la determinación de lactato en muestras reales, en concreto vino y suero, se estudió la influencia de posibles interferentes en la respuesta del biosensor. Por tanto, se obtuvo la

respuesta del biosensor frente a 0.7 mM de lactato en ausencia y en presencia de acetaminofén (paracetamol) (0.1 mM), ácido ascórbico (0.1 mM) y ácido úrico (0.1 mM). Mientras que en presencia de acetaminofén y ácido úrico no se observó ningún efecto sobre la respuesta del biosensor, en el caso del ácido ascórbico, que es fácilmente oxidable, se observó un incremento en la respuesta catalítica del 5%. Aun así, estos resultados sugieren que el dispositivo desarrollado puede ser usado para la medida de concentraciones de lactato en presencia de posibles interferentes.

1.2.7.2. Determinación de lactato en vino blanco

Se empleó el biosensor desarrollado para la determinación de lactato en una muestra real, vino blanco. Para ello, se utilizó el método de adición estándar, para minimizar los efectos de matriz, y no se realizó ningún tratamiento previo de separación en la muestra, sólo se llevó a cabo una dilución del vino, con el fin de obtener las condiciones de medida adecuadas (medio de trabajo y concentración dentro del intervalo lineal). En concreto, se realizó una dilución 1:50 del vino en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0. La concentración de lactato en vino se determinó a partir de las medidas realizadas con tres biosensores, obteniéndose un valor de $1.4 \pm 0.2 \text{ g L}^{-1}$.

La concentración de lactato obtenida utilizando el biosensor desarrollado se comparó con los obtenidos por un kit espectrofotométrico enzimático comercial. En concreto este kit se basa en la medida del NADH generado en la reacción de L-lactato a piruvato, catalizada por la L-LDH. Esta reacción está más favorecida en el sentido L-lactato + NAD^+ , por lo que es necesario introducir otra reacción que haga que el equilibrio se desplace hacia la generación del NADH. En concreto se emplea la reacción catalizada por la glutamato-piruvato transaminasa (D-GPT) que elimina el piruvato del medio y así desplaza el equilibrio.



Utilizando el kit comercial, para una muestra de vino tratada de la misma forma que con el biosensor, se obtuvo un valor de $1.36 \pm 0.06 \text{ g L}^{-1}$ de lactato. Los resultados obtenidos por ambos métodos son comparables, por lo que podemos decir que el biosensor desarrollado es adecuado para la determinación de lactato.

Tabla 1.2.7. Datos obtenidos en la determinación de L-lactato en vino blanco con el biosensor LOx/DNPs9/Au y con un kit enzimático comercial.

Muestra	LOx/DNPs9/Au	Kit enzimatico
	Contenido lactato (g L^{-1})	Contenido lactato (g L^{-1})
Vino blanco	1.4 ± 0.2	1.36 ± 0.06

1.2.7.3. Determinación de lactato en suero

También se quiso emplear el biosensor desarrollado para la determinación de lactato en una muestra biológica, dada la importancia de este analito en el ámbito sanitario. Se determinó el lactato presente en una muestra de suero humano comercial empleando, como en el caso anterior, el método de adición estándar para evitar los efectos de la matriz. El único tratamiento al que se sometió a la muestra fue un proceso de desproteinización, siguiendo el proceso descrito en el apartado 4.10 de materiales y métodos. La concentración de lactato se determinó a partir de las medidas realizadas con tres biosensores, obteniéndose un valor de $0.09 \pm 0.01 \text{ g L}^{-1}$. Al igual que con la muestra anterior, se compararon estos resultados con los obtenidos para una muestra tratada de la misma forma con el kit

enzimático comercial, obteniendo un valor de lactato en suero de $0.08 \pm 0.02 \text{ g L}^{-1}$, dato que es comparable al encontrado con el biosensor.

Tabla 1.2.8. Datos obtenidos en la determinación de lactato en suero con el biosensor LOx/DNPs9/Au y con un kit enzimático comercial.

Muestra	LOx/DNPs9/Au Contenido lactato (g L^{-1})	Kit enzimatico Contenido lactato (g L^{-1})
Suero	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.02

1.3

**BIOSENSORES 2D DE GLUCOSA O LACTATO BASADOS EN
ELECTRODOS DE ORO NANOESTRUCTURADOS CON
NANOPARTICULAS DE DIAMANTE DE 4 nm**

Debido a la buena respuesta catalítica obtenida para los biosensores desarrollados empleando las DNPs9 frente a la adición de sustrato, el siguiente paso consistió en el desarrollo de dos biosensores, uno de glucosa y otro de lactato, empleando también la adsorción física como método de inmovilización y la glucosa oxidasa (GOx) o la lactato oxidasa (LOx) como elementos de reconocimiento, pero, en este caso, usando las DNPs4 como nanomaterial para la nanoestructuración del electrodo.

1.3.1. Desarrollo del biosensor de glucosa o lactato

El electrodo de oro modificado con las nanopartículas de diamante de 4 nm (DNPs4/Au) se empleó para el desarrollo de biosensores, usando como elemento de reconocimiento la GOx o la LOx, siguiendo el mismo esquema de modificación del electrodo que en el caso descrito anteriormente, punto 1.2 de este capítulo, y que se muestra en la siguiente figura:

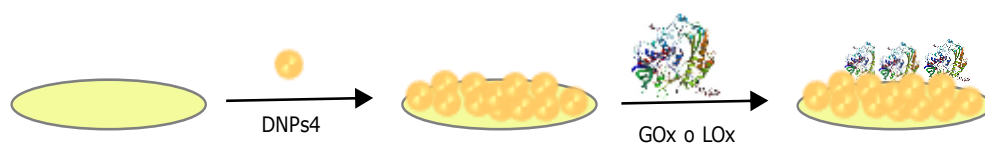


Fig. 1.3.1. Esquema de preparación del biosensor enzimático nanoestructurado con DNPs4.

Se inmovilizó la enzima por adsorción directa sobre el electrodo de oro previamente modificado con 5 μL de una suspensión de DNPs4 de concentración 1 mg mL^{-1} , siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.3 de materiales y métodos. Como en el caso de las nanopartículas de 9 nm, se empleó primero la GOx como elemento de reconocimiento (GOx/DNPs4/Au), para el estudio del sistema y

desarrollo de un biosensor de glucosa. Posteriormente, se desarrolló un biosensor de lactato (LOx/DNPs4/Au), siguiendo el mismo procedimiento.

1.3.2. Caracterización de las distintas etapas de desarrollo del biosensor

1.3.2.1. Caracterización morfológica mediante Raman

Se obtuvieron los espectros Raman de las distintas etapas del desarrollo del biosensor. Como se puede observar en la figura 1.3.2, el biosensor basado en la nanoestructuración con DNPs4 presenta un espectro muy similar al obtenido para el desarrollado con DNPs9. Antes de la inmovilización de la enzima, se observan los picos D y G asociados a los materiales de carbono (línea negra), y, tras la inmovilización de GOx (—), se identifican los picos entre 700 y 1750 cm^{-1} y el pico a 3000 cm^{-1} asociados a la enzima, como se puede ver por comparación con el espectro obtenido para la enzima inmovilizada sobre el oro (línea roja).

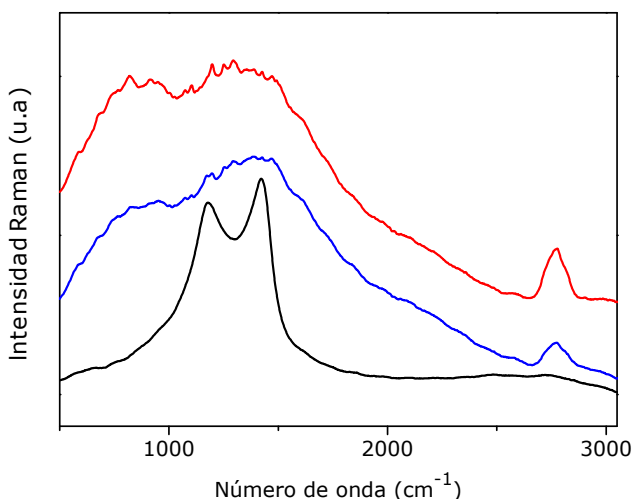


Fig. 1.3.2. Espectros Raman de las superficies DNPs4/Au (—), GOx/DNPs4/Au (—) y GOx/Au (—).

1.3.2.2. Caracterización electroquímica

En la figura 1.3.3 se presentan las respuestas ciclovoltamperométricas del biosensor en las distintas etapas seguidas para su desarrollo, en presencia de HMF, siguiendo el proceso descrito en el apartado 4.9 de materiales y métodos. A +0.30 V se observa la respuesta redox correspondiente a la oxidación-reducción del HMF. El comportamiento observado de este par redox en las distintas etapas del desarrollo del biosensor es el mismo que el observado en el caso del electrodo nanoestructurado con DNPs9. Se produce un incremento en las intensidades anódica y catódica al modificar el electrodo de oro con las DNPs4 (—), debido, como se comentó anteriormente, a la nanoestructuración del electrodo y a la capacidad de las DNPs de sufrir procesos de óxido-reducción gracias a los grupos funcionales insaturados presentes en su superficie. Sin embargo, en el voltamperograma correspondiente a GOx/DNPs4/Au (—), al inmovilizar la enzima sobre el electrodo nanoestructurado, este incremento de intensidad se ve disminuido, debido a que la enzima obstaculiza en parte la transferencia de carga entre el mediador y las nanopartículas.

Como era de esperar, por los resultados obtenidos para el electrodo DNPs4/Au expuestos en el apartado 1.1.2.3 de este capítulo, se observa también la presencia del prepico a +0.15 V tanto para el electrodo nanoestructurado con las DNPs4 como para el nanoestructurado con DNPs4 y la enzima.

Sin embargo, el pico a -0.40 V correspondiente a la reacción de oxidación-reducción del FAD/FADH₂, que aparece en los voltamperogramas de los biosensores basados en DNPs9 (figuras 1.2.7 y 1.2.8), en este caso, no se observa.

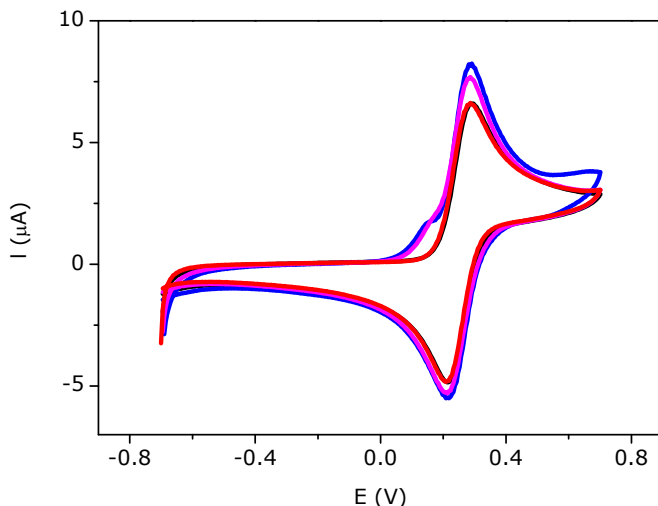


Fig. 1.3.3. Voltamperogramas cíclicos del electrodo de oro sin modificar (—), DNP4/Au (—), GOx/DNP4/Au (—) y GOx/Au (—), en presencia de HMF 1.0 mM pH 7.0. Velocidad de barrido: 100 mV s^{-1} .

Con el fin de corroborar que la presencia del pico a -0.40 V no depende de la enzima empleada, sino de la nanopartícula con la que se nanoestructuró el electrodo, se obtuvieron los voltamperogramas cíclicos de ambos biosensores, de glucosa y lactato, nanoestructurados con DNP4 y DNP9 en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0. Como se puede observar en la figura 1.3.4, el par redox a -0.40 V correspondiente a la oxido-reducción del FAD sólo se observa en el caso de los electrodos nanoestructurados con DNP9 (líneas rojas). Por tanto, parece que la transferencia electrónica entre las DNP4 y el cofactor de la enzima no se ve favorecida en todos los casos. Las DNP9 tienen un tamaño similar al de las enzimas GOx y LOx, permitiendo una disposición más adecuada que favorece la transferencia electrónica, mientras que las DNP4, al ser de menor tamaño, fuerzan una disposición de la enzima diferente y la transferencia de electrones está menos favorecida.

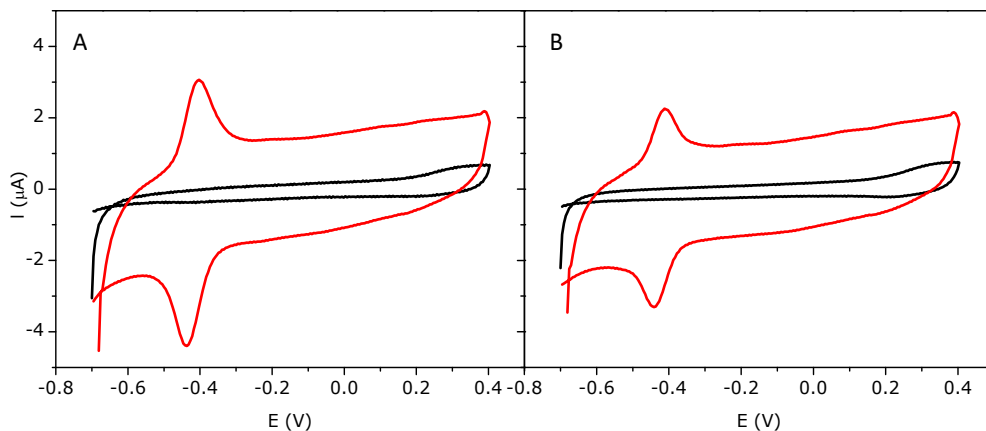


Fig. 1.3.4. Voltamperogramas cíclicos de A) GOx/DNPs4/Au (—) y GOx/DNPs9/Au (—) y B) LOx/DNPs4/Au (—) y LOx/DNPs9/Au (—) en tampón fosfato 0.1 mM pH 7.0. Velocidad de barrido: 100 mV s⁻¹.

1.3.3. Respuesta del biosensor de glucosa (GOx/DNPs4/Au)

El esquema que sigue el proceso catalítico de oxidación de la glucosa a gluconolactona, mediado por la GOx y empleando HMF como aceptor de electrones, es el mismo que el estudiado anteriormente para los electrodos modificados con DNPs9 (figura 1.2.9). La glucosa se oxida a gluconolactona sobre el electrodo, catalizada por la GOx y en presencia del mediador. En este proceso, el HMF reducido se oxida sobre el electrodo, pudiendo así utilizar la corriente catalítica producida para determinar la respuesta del biosensor. La regeneración de la enzima se realiza utilizando el HMF oxidado como aceptor de electrones.

En la figura 1.3.5 se presenta el voltamperograma cíclico obtenido del biosensor GOx/DNPs4/Au en una disolución de tampón acético/acetato 0.1 M pH 4.5 que contiene HMF 1.0 mM, en ausencia (—) y en presencia de 4.0 mM de glucosa (—).

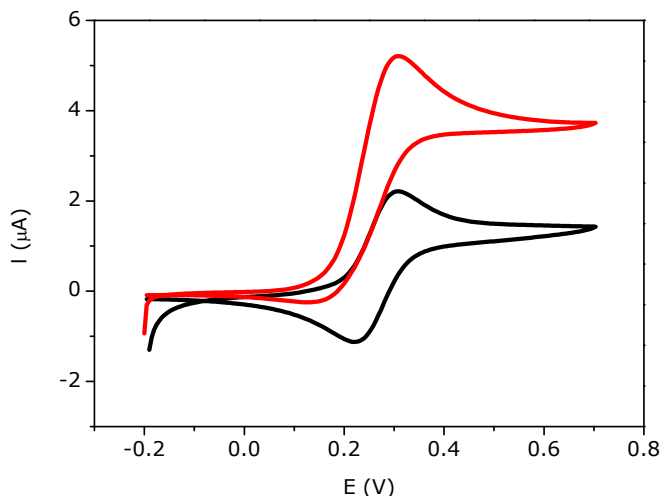


Fig. 1.3.5. Voltamperograma cíclico del biosensor de glucosa basado en un electrodo de oro nanoestructurado con DNP4 (GOx/DNP4/Au), en una disolución 0.1 M de tampón acético/acetato pH 4.5 que contiene HMF 1.0 mM, en ausencia (—) y en presencia de 4.0 mM de glucosa (—). Velocidad de barrido: 10 mV s^{-1} .

Antes de la adición del sustrato (—) se observa la respuesta redox del proceso de óxido-reducción del mediador HMF en disolución, a +0.30 V. Tras la adición de glucosa (—) se obtiene la respuesta característica de un proceso catalítico, con un aumento en la corriente de pico anódica y una disminución en la corriente catódica. Por tanto, teniendo en cuenta que la intensidad de la corriente catalítica es proporcional a la concentración de glucosa, esta puede ser empleada como señal analítica para la determinación de su concentración.

1.3.3.1. Obtención de la curva de calibrado

La respuesta voltamperométrica del biosensor en presencia de HMF frente a concentraciones crecientes de glucosa se presenta en la figura 1.3.6. Como era de esperar, no se observa prepico ya que, como se comentó anteriormente, el prepico,

asociado a la adsorción del HMF sobre las DNPs, sólo aparece a pH mayores de 6 (figura 1.1.17). Dado que el pH de trabajo óptimo de la GOx es 4.5 [Bankar, 2009], el estudio de su respuesta catalítica se llevó a cabo en esas condiciones.

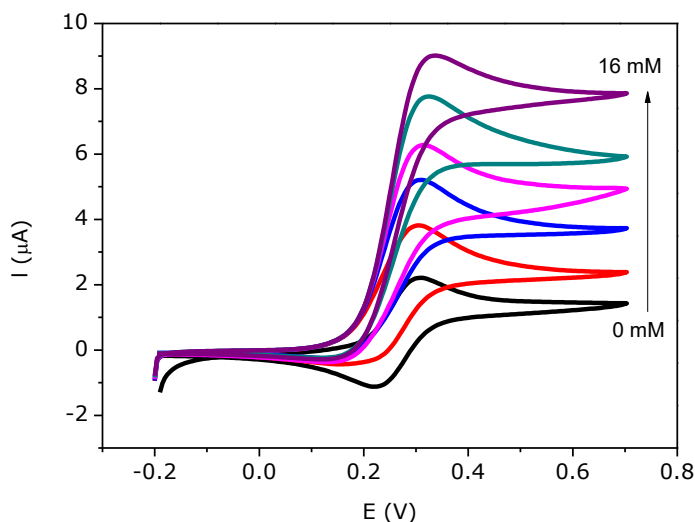


Fig. 1.3.6. Voltamperogramas cíclicos obtenidos para el biosensor GOx/DNPs4/Au en 0.1 M de tampón acético/acetato pH 4.5 que contiene HMF 1.0 mM, en ausencia y en presencia de 2.0 mM, 4.0 mM, 6.0 mM, 10.0 mM y 16.0 mM de glucosa. Velocidad de barrido: 10 mV s^{-1} .

La representación de la intensidad de corriente catalítica, calculada restando el valor de la intensidad máxima en presencia y en ausencia de glucosa a +0.30 V frente a la concentración de glucosa (figura 1.3.7), muestra una respuesta del biosensor que se ajusta a una cinética de Michaelis-Menten. Lo que confirma que el proceso está controlado por la cinética enzimática.

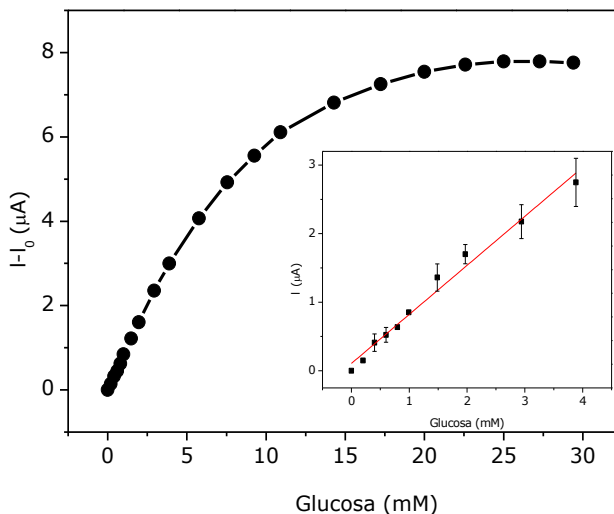


Fig. 1.3.7. Curva de calibrado para GOx/DNPs4/Au en tampón acético/acetato 0.1 M pH=4.5 conteniendo HMF 1.0 mM, en presencia de cantidades crecientes de sustrato. Velocidad de barrido: 10 mV s⁻¹. Inserto: intervalo lineal.

1.3.3.2. Determinación de las propiedades analíticas del biosensor de glucosa (GOx/DNPs4/Au)

Las propiedades analíticas del biosensor GOx/DNPs4/Au se presentan en la tabla 1.3.1, y se obtuvieron a partir del intervalo lineal de la curva de calibrado (inserto figura 1.3.7). Los datos representados se obtuvieron de la media de tres réplicas.

Tabla 1.3.1. Propiedades analíticas del biosensor GOx/DNPs4/Au.

	GOx/DNPs4/Au
<i>Respuesta lineal</i>	Hasta 4.0 mM
<i>Sensibilidad (μA mM⁻¹)</i>	0.75 ± 0.05
<i>Límite de detección (μM)</i>	134.6
<i>Límite de cuantificación (μM)</i>	449
<i>Reproducibilidad (R.S.D.%)</i>	6
<i>Estabilidad (%)</i>	50

La sensibilidad se obtuvo a partir de la pendiente de la recta, siendo de $0.75 \mu\text{A mM}^{-1}$. La respuesta obtenida fue lineal hasta una concentración de 4.0 mM. Los límites de detección y cuantificación se calcularon como tres y diez veces la desviación estándar del blanco, calculada de la medida de diez blancos, dividido por la sensibilidad, siendo 134.6 y 449 μM , respectivamente. Se calculó la reproducibilidad a partir de la respuesta obtenida de tres biosensores frente a la adición de 4.0 mM de glucosa. La estabilidad se calculó tras 30 días de almacenamiento, reteniendo un 50% de su respuesta inicial.

Comparando estos parámetros con los obtenidos para el biosensor de glucosa desarrollado mediante nanoestructuración con las DNPs9, GOx/DNPs9/Au, presentados en la tabla 1.2.1, se puede observar como el intervalo lineal obtenido para el biosensor GOx/DNPs4/Au es menor que el obtenido para el GOx/DNPs9/Au. También, comparando los límites de detección y cuantificación, así como la sensibilidad, de ambos biosensores, la nanoestructuración del electrodo de oro con las nanopartículas de diamante de 9 nm ofrece mejores resultados que el biosensor desarrollado empleando las DNPs4. Esto puede deberse a que la diferencia de tamaño entre ambas nanopartículas puede afectar a su capacidad para promover la transferencia electrónica entre la especie redox en disolución, el HMF, y el electrodo [Varley, 2014] y, además, puede forzar una conformación de la enzima diferente, afectando a su respuesta catalítica. Respecto a la estabilidad no se observó variación entre ambos biosensores.

Aun así, el biosensor GOx/DNPs4/Au presenta unos parámetros que son comparables con los encontrados en la bibliografía para otros biosensores de glucosa basados en nanomateriales de carbono [Shan, 2010; Chaturvedi, 2014; Wang Y., 2014].

1.3.4. Respuesta del biosensor de lactato (LOx/DNPs4/Au)

El desarrollo del biosensor de lactato se llevó a cabo siguiendo el mismo esquema de modificación que en los casos anteriores, empleando DNPs4 para la nanoestructuración del electrodo y la enzima LOx como elemento de reconocimiento. El esquema del proceso catalítico que tiene lugar es el mismo que en el caso del biosensor LOx/DNPs9/Au (figura 1.2.14). En la figura 1.3.8 se representan los voltamperogramas cíclicos obtenidos antes y después de la adición de lactato. A diferencia del biosensor GOx/DNPs4/Au, en este caso las medidas se realizaron a pH 7.0, por lo que, como es de esperar, aparece el prepico asociado al proceso de adsorción del HMF sobre las DNPs4 a +0.15 V (—). Además, tras la adición de sustrato (—), se observa respuesta electrocatalítica, no sólo en el par redox característico correspondiente a la oxido-reducción del HMF, sino también en el prepico. Esto indica que, tanto las moléculas de HMF en disolución como las que están adsorbidas sobre las nanopartículas están involucradas en el proceso catalítico.

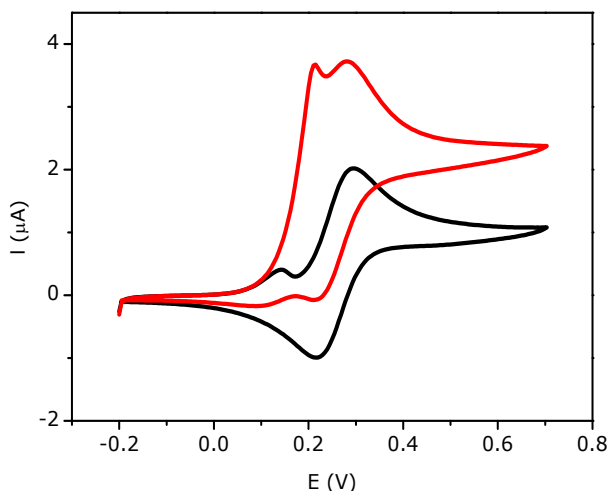


Fig. 1.3.8. Respuesta voltamperométrica obtenida para el biosensor LOx/DNPs4/Au, en 0.1 M de tampón fosfato pH 7.0 que contiene HMF 1.0 mM, en ausencia (—) y en presencia de 0.5 mM de lactato (—). Velocidad de barrido: 10 mV s⁻¹.

1.3.4.1. Obtención de la curva de calibrado

Con el fin de estudiar la linealidad de la respuesta del biosensor frente a lactato, se obtuvieron los voltamperogramas en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de lactato (figura 1.3.9).

Se representó el incremento de intensidad de corriente medido tanto en el prepico, a +0.15 V, como en el pico anódico del par redox que aparece a +0.30 V, frente a la concentración de lactato. Las curvas de calibrado obtenidas se presentan en la figura 1.3.10.

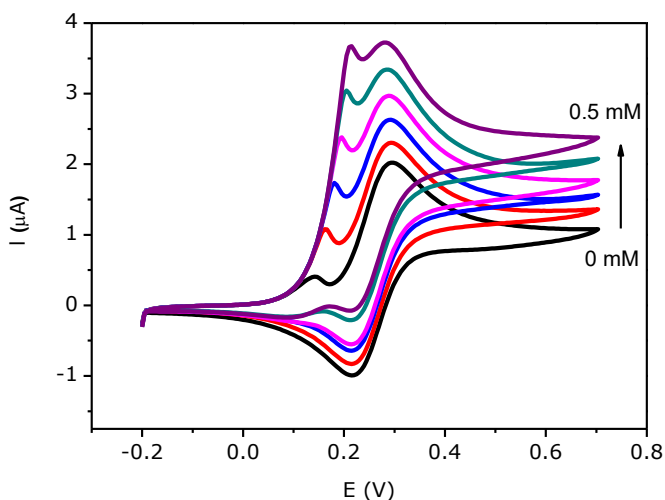


Fig. 1.3.9. Respuesta voltamperométrica obtenida para el biosensor LOx/DNPs4/Au en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0, conteniendo HMF 1.0 mM, en ausencia y en presencia de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mM de lactato. Velocidad de barrido: 10 mV s^{-1} .

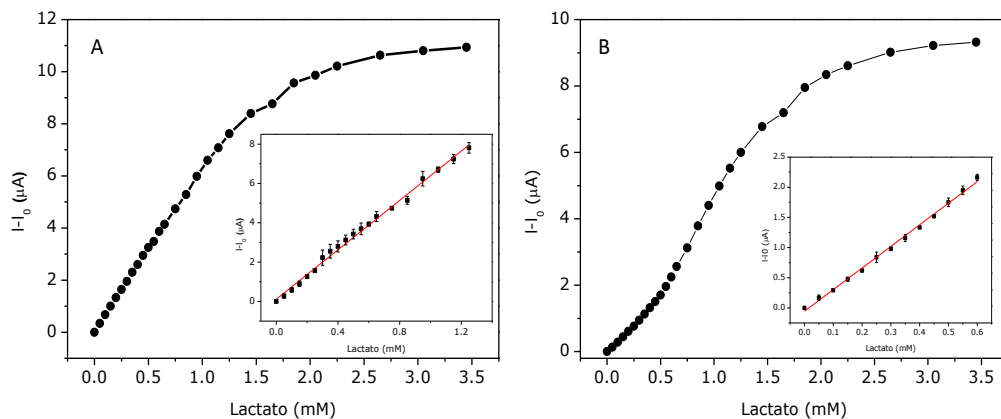


Fig. 1.3.10. Curvas de calibrado obtenidas de los voltamperogramas cíclicos midiendo la intensidad de corriente en +0.15 V (A), y +0.30 V (B). Inserto: intervalos lineales.

La curva de calibrado obtenida midiendo la intensidad de corriente a +0.15 V (figura 1.3.10 A) se ajusta al modelo de Michaelis-Menten. Sin embargo, para la curva de calibrado obtenida midiendo a +0.30 V (figura 1.3.10 B) se obtiene una pequeña onda sigmoideal a concentraciones bajas de lactato, lo que representa una desviación respecto del modelo de Michaelis-Menten. Este comportamiento es característico de las enzimas alostéricas. Las enzimas alostéricas presentan estructuras con varias subunidades, y poseen otros sitios activos en su estructura distintos a su centro activo. Si una molécula se une a uno de esos sitios activos puede cambiar la conformación de la enzima facilitando o inhibiendo la unión de los otros sustratos en los otros sitios activos [Monod, 1965]. En este caso en concreto, podemos pensar que el HMF parcialmente adsorbido sobre las DNPs puede modificar la conformación de la LOx, que está inmovilizada sobre las nanopartículas, influyendo en su respuesta catalítica.

Aun así, la desviación observada es pequeña por lo que podemos decir que ambas curvas de calibrado se ajustan al modelo de Michaelis-Menten, y, por tanto, podrían utilizarse para la determinación de lactato.

1.3.4.2. Determinación de las propiedades analíticas del biosensor de lactato (LOx/DNPs4/Au)

De ambas curvas de calibrado se obtuvieron los parámetros analíticos, que se presentan en la tabla 1.3.2.

Tabla 1.3.2. Propiedades analíticas obtenidas para el biosensor LOx/DNPs4/Au, midiendo la intensidad de corriente a +0.15 V y a +0.30 V.

	<i>LOx/DNPs4/Au</i> <i>a +0.15 V</i>	<i>LOx/DNPs4/Au</i> <i>a +0.30 V</i>
<i>Respuesta lineal</i>	Hasta 1.2 mM	Hasta 0.55 mM
<i>Sensibilidad ($\mu\text{A mM}^{-1}$)</i>	6.10 ± 0.05	3.6 ± 0.7
<i>Límite de detección (μM)</i>	5.3	9.1
<i>Límite de cuantificación (μM)</i>	20	30
<i>Reproducibilidad (R.S.D.%)</i>	8	7
<i>Estabilidad (%)</i>	48	50

La sensibilidad se calculó a partir de la pendiente de la recta. Los límites de detección y determinación se calcularon como tres y diez veces la desviación del blanco dividido entre la sensibilidad. Se calculó la desviación estándar a partir de diez medidas del blanco. La reproducibilidad se calculó empleando 3 biosensores diferentes y se evaluó la estabilidad tras 30 días de almacenamiento.

El intervalo lineal obtenido a partir de la curva de calibrado medida a +0.15 V es mayor que el obtenido a partir de la curva de calibrado medida a +0.30 V. También, los valores de sensibilidad, límite de detección y cuantificación, así como los de reproducibilidad, son mejores para la curva obtenida midiendo a +0.15 V. Estos resultados concuerdan con la hipótesis de que, de alguna manera, el HMF adsorbido sobre las DNPs afecta, a bajas concentraciones, a la actividad de la enzima.

Si comparamos los parámetros obtenidos midiendo a +0.30 V con los obtenidos para el biosensor de lactato desarrollado anteriormente con la nanopartícula de 9 nm, LOx/DNPs9/Au, (tabla 1.2.2), podemos observar que los resultados son muy similares. Presentan unos intervalos lineales de hasta 0.7 mM para el biosensor modificado con las DNPs4 y de hasta 0.55 mM para LOx/DNPs9/Au. La sensibilidad en ambos casos también es muy similar, de 4.00 y 3.6 $\mu\text{A mM}^{-1}$, respectivamente. En cuanto a los límites de detección y cuantificación, los valores obtenidos son ligeramente mejores para el caso del biosensor nanoestructurado con las DNPs4, y tanto la reproducibilidad como la estabilidad no presentan variación entre ambos biosensores. Estos resultados parecen indicar que el tamaño de la nanopartícula no es un factor muy influyente.

También, los parámetros analíticos obtenidos para el biosensor LOx/DNPs4/Au, obtenidos midiendo tanto a +0.15 V como a +0.30 V son comparables, e incluso presentan mejoras respecto a los descritos en la bibliografía para biosensores de lactato modificados con nanomateriales y que emplean el HMF como mediador redox (tabla 1.2.3). En concreto, mejora la sensibilidad respecto al biosensor basado en la nanoestructuración de un electrodo de oro mediante MPTS y que contiene nanopartículas de oro inmovilizadas en la red sol-gel, desarrollado por Parra-Alfambra y col. [Parra-Alfambra, 2011] y mejora también tanto la sensibilidad como los límites de detección obtenidos para otros biosensores modificados con DTSP [Parra-Alfambra, 2006a] y con grafeno reducido electroquímicamente [Casero, 2013]. Además, presentan una ventaja respecto a los biosensores previamente descritos, ya que se puede determinar la concentración de lactato midiendo a un potencial menor, gracias a la presencia del prepico, lo que disminuye aún más la posibilidad de presentar interferencias.

Por otro lado, también los límites de detección obtenidos con el biosensor LOx/DNPs4/Au desarrollado son comparables con los obtenidos mediante los kits enzimáticos comerciales (tabla 1.3.3).

Tabla 1.3.3. Comparación del límite de detección (en mg L^{-1}) obtenido para el biosensor LOx/DNPs4/Au con respecto a otros métodos de determinación de lactato (kits enzimáticos comerciales), medido a +0.15 V y a +0.30 V.

Métodos para la determinación de lactato	LD (mg L^{-1})
Biosensor LOx/DNPs4/Au	0.5 (+0.15 V); 0.9 (+0.30 V)
Kit enzimático Biosystems	20
Kit enzimático Boehringer Mannheim	0.3
Kit enzimático Megazyme	0.21

1.3.4.3. Respuesta del biosensor de lactato (LOx/DNPs4/Au) frente a adición de lactato obtenida mediante cronoamperometría

Para determinaciones analíticas es más usual utilizar los valores obtenidos mediante cronoamperometría que mediante voltamperometría cíclica, más empleada para caracterización. Por esto, se obtuvo también la respuesta del biosensor mediante cronoamperometría de un solo pulso, con el fin de comparar los parámetros obtenidos por ambos métodos electroquímicos, aplicando un potencial de +0.35 V durante 60 segundos (figura 1.3.11).

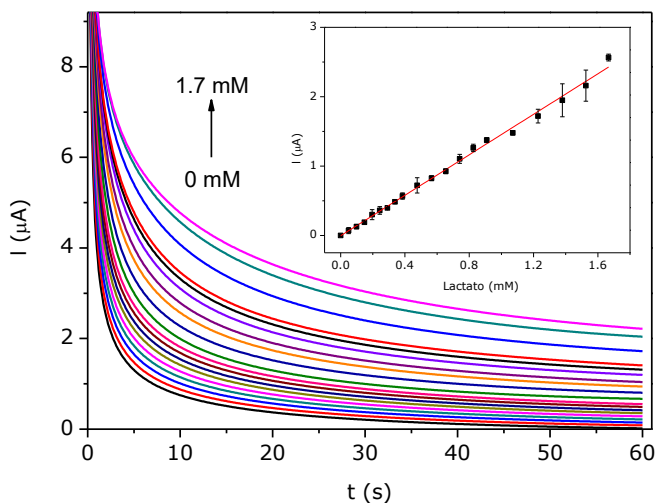


Fig. 1.3.11. Cronoamperogramas obtenidos para el biosensor LOx/DNPs4/Au en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 conteniendo HMF 1.0 mM, en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de lactato. Inserto: Corriente en el estado estacionario a 50 segundos frente a concentración de lactato.

De la representación de la intensidad de corriente, medida a +0.35 V a los 50 s, frente a la concentración de lactato se obtiene una recta, inserto de la figura 1.3.11, a partir de la cual se determinaron los parámetros analíticos presentados en la tabla 1.3.4.

Tabla 1.3.4. Propiedades analíticas del biosensor LOx/DNPs4/Au a partir de las medidas obtenidos mediante cronoamperometría.

	LOx/DNPs4/Au
Respuesta lineal	Hasta 1.7 mM
Sensibilidad ($\mu\text{A mM}^{-1}$)	1.45 ± 0.05
Límite de detección (μM)	200
Límite de cuantificación (μM)	670

Comparando los parámetros obtenidos por ambas técnicas, voltamperometría cíclica y cronoamperometría, podemos observar cómo, empleando la cronoamperometría se obtiene un mayor intervalo lineal que el que se obtiene mediante voltamperometría cíclica. Sin embargo, tanto los valores de la sensibilidad como de los límites de detección y cuantificación son mejores empleando la voltamperometría cíclica, tanto para el caso de los parámetros obtenidos a partir de la curva de calibrado medida a +0.15 V como los obtenidos midiendo a +0.30 V. Por tanto, se empleó la voltamperometría cíclica como técnica analítica para la determinación de lactato en muestras reales.

1.3.5. Respuesta de los biosensores de glucosa (GOx/DNPs4/Au) y lactato (LOx/DNPs4/Au) obtenidos a velocidad de barrido 100 mV s⁻¹

Al igual que en el caso anterior para las nanopartículas de 9 nm, se estudió la respuesta de los biosensores desarrollados empleando DNPs4 para la nanoestructuración del electrodo, GOx/DNPs4/Au y LOx/DNPs4/Au, frente a la adición de sustrato a una velocidad de barrido de 100 mV s⁻¹, con el objetivo de comprobar si la reacción enzimática que tiene lugar es suficientemente rápida para poder observarla a esta velocidad. A esta velocidad de barrido el prepico no aparece, como se comentó en el apartado 1.1.2.3.

En la figura 1.3.12 se presentan los voltamperogramas cíclicos obtenidos en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de sustrato para ambos biosensores. En ambos casos se observa la respuesta electrocatalítica de los biosensores.

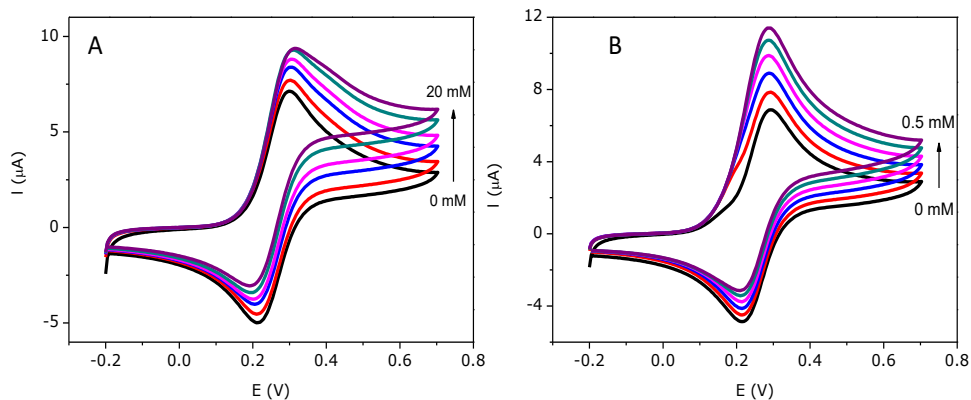


Fig. 1.3.12. Voltamperogramas cíclicos obtenidos para (A) GOx/DNPs4/Au en una disolución 0.1 M de tampón acético/acetato pH 4.5 que contiene HMF 1.0 mM, en ausencia y en presencia de 1.0, 3.0, 5.0, 10 y 20 mM de glucosa y (B) para LOx/DNPs4/Au en una disolución 0.1 M de tampón fosfato pH 7.0 que contiene HMF 1.0 mM, en ausencia y en presencia de 0.1, 0.2, 0.3 y 0.5 mM de lactato. Velocidad de barrido: 100 mV s^{-1} .

Las curvas de calibrado obtenidas para cada biosensor se presentan en la figura 1.3.13 y del intervalo lineal de cada una de ellas (insertos figura 1.3.13), se obtuvieron los parámetros analíticos correspondientes, presentados en la tabla 1.3.5, siendo estos la media de tres réplicas.

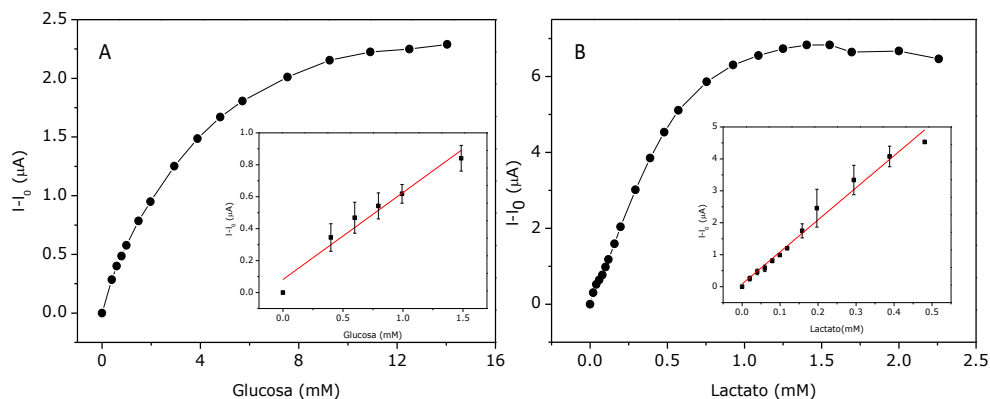


Fig. 1.3.13. Curvas de calibrado obtenidas a partir de la corriente electrocatalítica, medida a +0.30 V, menos I_0 de los voltamperogramas obtenidos para los biosensores (A) GOx/DNPs4/Au, en tampón acético/acetato 0.1 M pH=4.5 conteniendo HMF 1.0 mM en presencia de cantidades crecientes de glucosa y (B) LOx/DNPs4/Au, en tampón fosfato 0.1 M pH=7.0 conteniendo HMF 1.0 mM en presencia de cantidades crecientes de lactato. Velocidad de barrido: 100 mV s^{-1} . En los insertos de ambas figuras se presenta el intervalo lineal de respuesta.

Tabla 1.3.5. Propiedades analíticas de los biosensores GOx/DNPs4/Au y LOx/DNPs4/Au cuando las medidas se realizan a 100 mV s^{-1} .

	GOx/DNPs4/Au	LOx/DNPs4/Au
<i>Respuesta lineal</i>	Hasta 1.5 mM	Hasta 0.5 mM
<i>Sensibilidad ($\mu\text{A mM}^{-1}$)</i>	0.5 ± 0.2	9.5 ± 0.4
<i>Límite de detección (μM)</i>	69	6
<i>Límite de cuantificación (μM)</i>	228	21

A partir de la pendiente de la recta de calibrado se calculó la sensibilidad para ambos biosensores, obteniéndose unos valores de $0.5 \mu\text{A mM}^{-1}$ para GOx/DNPs4/Au y $9.5 \mu\text{A mM}^{-1}$ para LOx/DNPs4/Au. De la media de tres y diez veces la desviación estándar del blanco dividido por la sensibilidad se calcularon los límites de detección y de cuantificación, tomando la desviación estándar de 10 medidas del blanco. Los límites de detección y cuantificación obtenidos para el

biosensor GOx/DNPs4/Au se obtuvieron unos valores de 69 μM y 228 μM respectivamente, y un intervalo lineal hasta 1.5 mM. Los límites de detección y cuantificación obtenidos para el biosensor LOx/DNPs4/Au fueron de 6 μM y 21 μM , respectivamente, y el intervalo lineal obtenido hasta 0.5 mM.

Comparando estos parámetros con los obtenidos midiendo la respuesta de ambos biosensores a una velocidad de 10 mV s^{-1} (tablas 1.3.1 y 1.3.2), no se observa ninguna mejora significativa. Sin embargo, pone de manifiesto que los procesos electrocatalíticos que tienen lugar son rápidos y pueden ser monitorizados a velocidades de barrido elevadas, lo que permitiría una reducción en los tiempos de análisis.

1.3.6. Cálculo de parámetros y constantes de interés del biosensor de lactato (LOx/DNPs4/Au)

1.3.6.1. Determinación de la constante catalítica para lactato (k)

Al igual que para el biosensor de lactato desarrollado empleando las DNPs9, en este caso también se calculó la constante catalítica (k) mediante el método Galus [Galus, 1991], siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5.1 de materiales y métodos. Las rectas obtenidas de la representación de $I_{\text{cat}}/I_{\text{dif}}$ frente a la raíz cuadrada del tiempo de medida a distintas concentraciones de lactato se presentan en la figura 1.3.14. Representando las pendientes obtenidas de estas rectas frente a la raíz cuadrada de la concentración de lactato, obtenemos una nueva recta (inserto figura 1.3.14), de cuya pendiente se obtuvo el valor de la constante catalítica. En este caso, el resultado obtenido fue de $(4.63 \pm 1.07) \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. El valor obtenido es menor que el que presenta el biosensor nanoestructurado con DNPs9 ($k_{\text{LOx/DNPs9/Au}} = 1.53 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), pero sigue siendo superior, del orden de 20 veces, al obtenido para el biosensor sin nanoestructurar, modificado sólo con la

enzima LOx, ($k_{\text{LOx/Au}} = 20 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). La diferencia en el valor de la constante catalítica que presenta el biosensor modificado con DNPs4 respecto al modificado con DNPs9 puede ser debido a que la conformación que adopta la enzima en el caso de las DNPs9 favorece unas mejores propiedades catalíticas. Aun así, estos datos confirman que la nanoestructuración del electrodo empleando DNPs4 mejora las propiedades catalíticas del biosensor de lactato en comparación con el electrodo modificado sólo con la enzima.

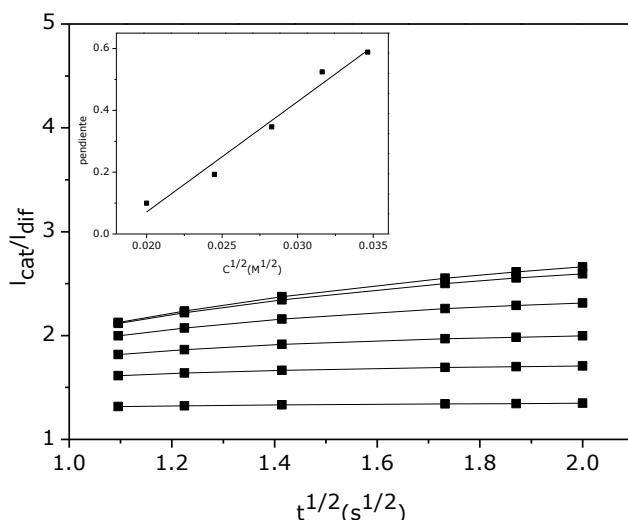


Fig. 1.3.14. Representación de $I_{\text{cat}}/I_{\text{dif}}$ frente a $t^{1/2}$ para distintas concentraciones de lactato sobre LOx/DNPs4/Au. Inserto: Representación de las pendientes de las rectas frente a la raíz cuadrada de la concentración.

1.3.6.2. Cálculo de los parámetros cinéticos del biosensor de lactato (LOx/DNPs4/Au)

Con el fin de corroborar si el comportamiento cinético del biosensor nanoestructurado con DNPs4 se ajusta al modelo de Michaelis-Menten, se calculó el coeficiente de Hill, de acuerdo con la ecuación 1.2.5, midiendo las intensidades obtenidas mediante voltamperometría cíclica tanto para el prepico, a +0.15 V,

como para el pico a +0.30 V. Las representaciones del $\log [(i_{\max}/i)-1]$ frente al $\log [\text{lactato}]$ se representa en la figura 1.3.15. De la pendiente de las rectas obtenidas, cambiadas de signo, se obtuvieron los valores del coeficiente de Hill, siendo 1.58 y 1.60, para el prepico y el pico a +0.30 V, respectivamente. Esta pequeña desviación puede deberse, como se comentó anteriormente, a que el HMF parcialmente adsorbido sobre las DNP's varía la conformación de algunas de las enzimas inmovilizadas, modificando su respuesta catalítica. Aun así, siguen siendo cercanos a la unidad, por lo que podemos decir que la respuesta del biosensor, medida en cualquiera de los dos potenciales, se ajusta al modelo de Michaelis-Menten.

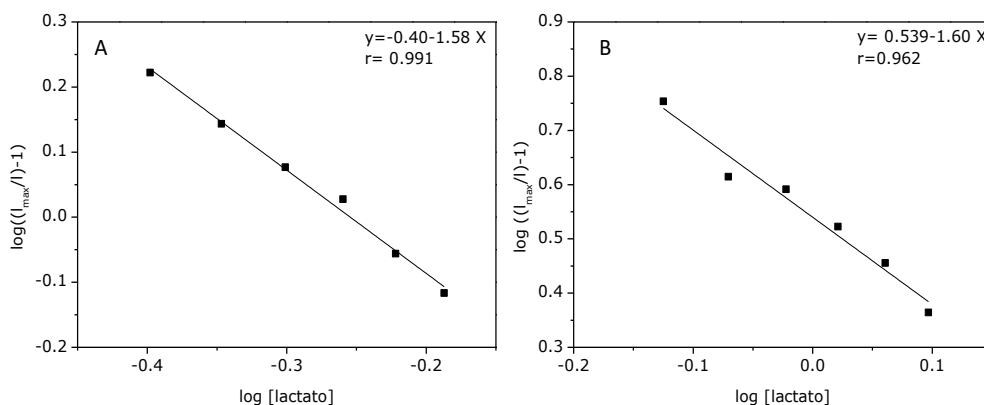


Fig. 1.3.15. Representaciones de la ecuación de Hill obtenidas para el biosensor LOx/DNPs4/Au midiendo la intensidad a +0.15 V (A) y a +0.30V (B).

Se calcularon los parámetros K_M y V_{\max} empleando la representación de Lineweaver-Burk [Lineweaver, 1934], mediante la ecuación 1.2.6. En la figura 1.3.16 se presentan las gráficas de la inversa de la intensidad de corriente normalizada frente a la inversa de la concentración de lactato, medida a los dos potenciales, +0.15 y +0.30 V. Del corte de las rectas con el eje de ordenadas se obtiene $1/V_{\max}$, y del punto de corte con el eje de abscisas se obtiene $-1/K_M$.

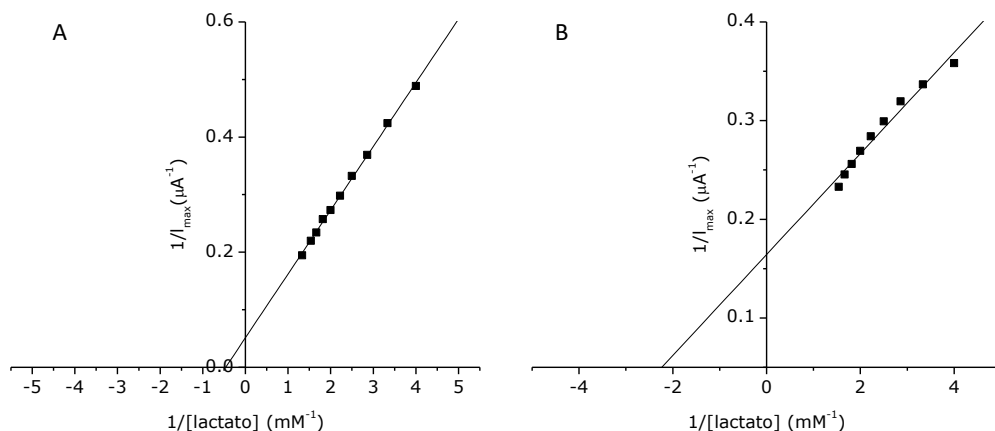


Fig. 1.3.16. Representación de Lineweaver-Burk del biosensor de lactato LOx/DNPs4/Au medio a +0.15 V (A) y a +0.30 V (B).

Los valores de K_M y V_{\max} obtenidos para el prepico, a +0.15 V, fueron de 1.69 mM y 16 μA , respectivamente. Para el caso del pico a +0.30 V se obtuvieron unos valores de $K_M = 0.39$ mM y $V_{\max} = 6.08$ μA . Los valores de K_M obtenidos para el pico a +0.30 V demuestran que la enzima LOx inmovilizada sobre las DNPs4 presenta una buena actividad frente a lactato, ya que son valores comparables a los descritos en la bibliografía para otros biosensores de lactato y próximos al valor obtenido para la enzima libre (0.88 mM [Iwuoha, 1999], 0.22 mM [Zanini, 2010] y la enzima libre 0.23 mM [Suman, 2005]). Además, también es un valor comparable al encontrado para el biosensor desarrollado con las DNPs9 (K_M LOx/DNPs9/Au: 0.36 mM). Sin embargo, el valor obtenido midiendo a +0.15 V es algo más elevado que el obtenido para el biosensor desarrollado con las nanopartículas de mayor tamaño y que los reportados en la bibliografía, lo que indica un menor grado de afinidad de la enzima por el sustrato. Esto puede ser debido a que el HMF inmovilizado sobre las DNPs4 disminuye, en cierta medida, la actividad frente a lactato.

1.3.7. Aplicación del biosensor LOx/DNPs4/Au a la determinación de lactato en muestras reales

1.3.7.1. Estudio de interferentes

Para comprobar la selectividad del biosensor de lactato desarrollado se estudió su respuesta en presencia de posibles interferentes, determinando así, su idoneidad para la determinación de lactato en muestras reales, de matrices muy diferentes (vino y suero).

Se obtuvo la respuesta voltamperométrica del biosensor frente a 0.7 mM de lactato en presencia de alguna sustancia que pueden acompañar al lactato en las muestras donde este puede estar presente. En concreto acetaminofén (paracetamol) (0.1 mM), ácido ascórbico (0.1 mM) y ácido úrico (0.1 mM). Sólo en el caso del ácido ascórbico se observó variación en la respuesta del biosensor al compararla con la respuesta en ausencia de interferente. La variación corresponde a un aumento de intensidad del 5%. Teniendo esto en cuenta se puede afirmar que el biosensor desarrollados puede emplearse para la determinación de lactato en muestras reales.

1.3.7.2. Determinación de lactato en vino blanco

Se comprobó la validez del biosensor para la determinación de lactato en muestras reales, midiendo el analito en vino. Para ello se empleó el método de adición estándar, con el fin de minimizar los efectos de matriz. No se realizó tratamiento previo de la muestra, tan sólo se diluyó para obtener las condiciones de medida adecuadas. La dilución que se realizó fue 1:100 del vino en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0. De la media de tres biosensores se obtuvo la concentración de lactato en la muestra, siendo de $1.4 \pm 0.1 \text{ g L}^{-1}$. El resultado se comparó con el obtenido

empleando el kit espectrofotométrico enzimático comercial, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.11 de materiales y métodos. Ambos resultados se presentan en la tabla 1.3.6 y, como se puede comprobar, ambos resultados son muy similares. Por tanto, el biosensor es adecuado para la determinación de lactato en vino.

Tabla 1.3.6. Datos obtenidos en la determinación de lactato en vino blanco con el biosensor LOx/DNPs4/Au y con un kit enzimático comercial.

Muestra	LOx/DNPs4/Au	Kit enzimático
	Contenido lactato (g L^{-1})	Contenido lactato (g L^{-1})
Vino blanco	1.39 ± 0.08	1.36 ± 0.06

1.3.7.3. Determinación de lactato en suero

De igual manera, el biosensor desarrollado se empleó también para la determinación de lactato en suero humano comercial, mediante el método de adición estándar. Se sometió a la muestra a un proceso de desproteización, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.10 de materiales y métodos. De la media de tres biosensores se obtuvo el valor de lactato para esta muestra, siendo el resultado de $0.07 \pm 0.01 \text{ g L}^{-1}$. El resultado obtenido se comparó con el calculado empleando el kit enzimático comercial para una muestra tratada de la misma forma. En la tabla 1.3.7 se observa que ambos resultados son comparables por tanto el biosensor es adecuado para la determinación de lactato en suero.

Tabla 1.3.7. Datos obtenidos en la determinación de lactato en suero con el biosensor LOx/DNPs4/Au y con un kit enzimático comercial.

Muestra	LOx/DNPs4/Au	Kit enzimatico
	Contenido lactato (g L^{-1})	Contenido lactato (g L^{-1})
Suero	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.02

1.4

BIOSENSOR 3D DE LACTATO BASADO EN ELECTRODOS DE ORO MODIFICADOS CON NANOPARTÍCULAS DE DIAMANTE CON METODOLOGÍA SOL-GEL

Como se ha comentado en la introducción, dentro de los métodos de inmovilización, el proceso sol-gel permite crear un entorno adecuado para el mantenimiento tanto de la estructura como de la actividad enzimática, por eso, se desarrolló un biosensor de lactato basado en la modificación de electrodos de oro mediante el proceso sol-gel encapsulando en su interior nanopartículas de diamante de 9 nm (DNPs9) y, como elemento de reconocimiento, la enzima LOx. Como precursor para la formación de la red tridimensional sol-gel se empleó el 3-mercaptopropiltrimetoxisilano (MPTS).

1.4.1. Desarrollo del biosensor de lactato

Para el desarrollo del biosensor en primer lugar se preparó la mezcla sol-gel, empleando MPTS como precursor, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 1.2 de materiales y métodos [Parra-Alfambra, 2011]. Una vez preparada la mezcla sol-gel, la modificación de los electrodos de oro para el desarrollo del biosensor se llevó a cabo siguiendo el esquema 1.4.1.

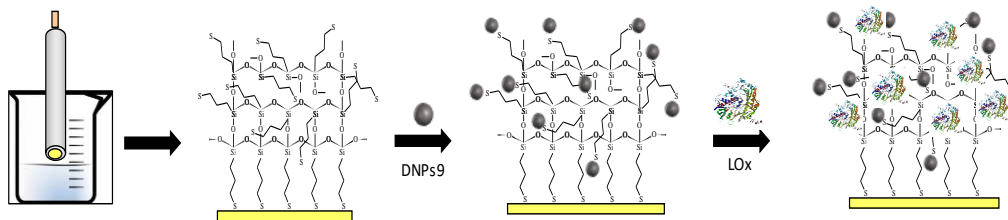


Fig. 1.4.1. Esquema de preparación del biosensor de lactato nanoestructurado con MPTS y DNPs9.

El electrodo de oro, previamente activado, se modificó con MPTS por inmersión en la disolución sol-gel durante una hora. De esta manera el sol-gel queda quimisorbido sobre el electrodo y forma la red tridimensional de silicato (MPTS/Au) [Jena, 2006]. Después, sobre el electrodo MPTS/Au se depositaron 5 μ L de una

dispersión 1 mg mL^{-1} en agua de las DNPs9 y se dejó secar al aire. Finalmente, se modificó con la enzima, depositando $5 \text{ }\mu\text{L}$ sobre la superficie del electrodo (LOx/DNPs9/MPTS/Au) dejándose secar al aire.

1.4.2. Caracterización de las distintas etapas de desarrollo del biosensor

1.4.2.1. Caracterización de la superficie MPTS/Au mediante IR

En primer lugar, se procedió a la caracterización del primer paso en el desarrollo del biosensor, la modificación del electrodo con el material sol-gel. Para ello, se obtuvo el espectro de IR para una placa de oro modificada al igual que el electrodo siguiendo el proceso descrito en el apartado 4.8 de materiales y métodos.

La modificación del electrodo de oro con el material sol-gel se produce por formación de enlaces Si-Au, previa deshidrogenación de los grupos tioles. Por lo tanto, tras la reacción, la banda asociada a las vibraciones S-H que deben aparecer a 2550 cm^{-1} , no se observaría. En la figura 1.4.2 que presenta el espectro FTIR de una placa de oro modificada con MPTS no se observa esta banda, confirmando que la modificación se ha producido con éxito.

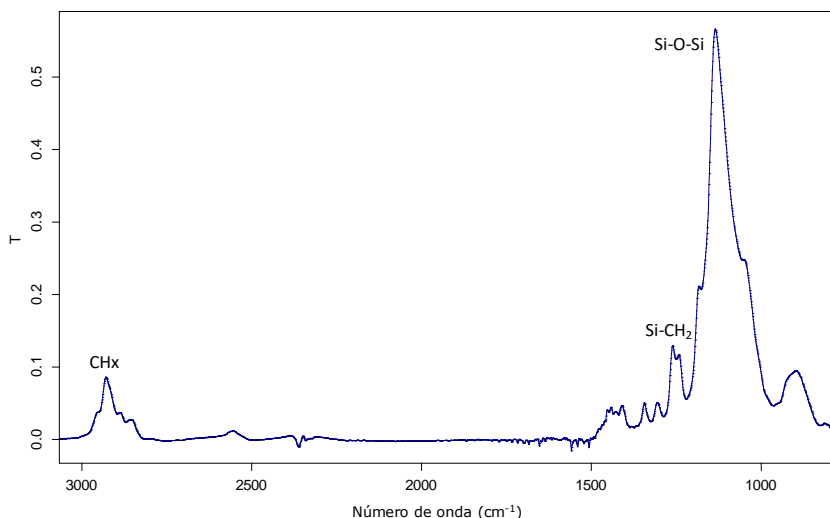


Fig. 1.4.2. Espectro FTIR de una placa de oro modificada con MPTS.

1.4.2.2. Caracterización morfológica mediante AFM

También se procedió a la caracterización morfológica de la superficie del biosensor en los distintos pasos de su preparación. La caracterización por microscopia de fuerzas atómicas será básica para controlar la disposición espacial de las nanopartículas y cuantificar la rugosidad de la superficie del biosensor con el fin de establecer su influencia en su funcionamiento.

En la figura 1.4.3 se presentan las imágenes de AFM obtenidas, en tampón fosfato, para una placa de oro modificada con DNPs9 (DNPs9/Au), una placa modificada con MPTS (MPTS/Au) y la modificada con MPTS y DNPs9 (DNPs9/MPTS/Au), siguiendo el proceso descrito en el apartado 4.5.4 de materiales y métodos. La superficie modificada con las DNPs9 (figura 1.4.3 A) presenta estructuras de entre 10 y 30 nm de tamaño lateral, apareciendo también algún agregado de mayor tamaño, y una rugosidad superficial de 12 nm. La morfología que presenta la superficie MPTS/Au (figura 1.4.3 B) es muy diferente. Se observa la superficie mucho más borrosa, con estructuras granulares de aproximadamente 10 nm de ancho y una rugosidad

superficial mucho menor, de 0.2 nm. Al incluir las DNPs9 (figura 1.4.3 C) se obtiene una imagen más parecida a la de la superficie DNPs9/Au (figura 1.4.3 A). Se pueden observar las estructuras nanogranulares correspondiente a las DNPs9, presentando también agregados, aunque se observan más borrosas, y se produce un aumento en la rugosidad superficial, 20-25 nm. Por tanto, como era de esperar, la inclusión de las DNPs9 en la red tridimensional formada por el sol-gel aumenta la rugosidad superficial.

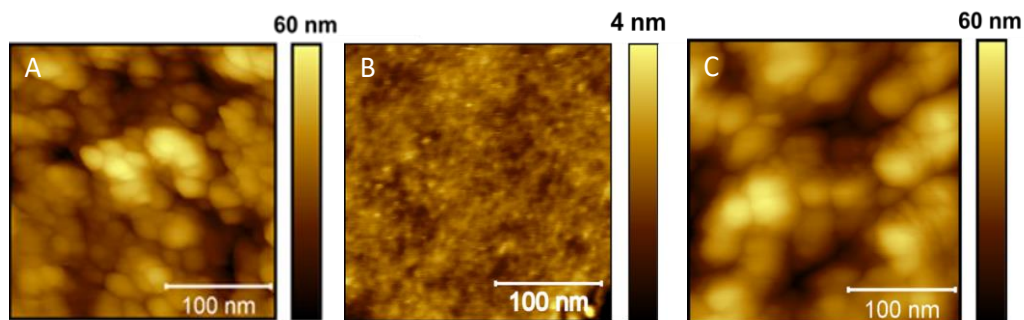


Fig. 1.4.3. Imagen AFM en modo contacto intermitente, $250 \times 250 \text{ nm}^2$, de la placa DNPs9/Au (A), la placa MPTS/Au (B) y la placa DNPs9/MPTS/Au (C).

Con el fin de distinguir entre los dos componentes que forman el nanocompósito, el MPTS y las DNPs9, se realizaron medidas de microscopía de fuerza Kelvin (KFM), también conocida como microscopía de potencial de superficie, para la placa DNPs9/MPTS/Au. Como se comentó anteriormente (apartado 3.2.2 de materiales y métodos), la microscopía de fuerza Kelvin es una variante de no contacto de la microscopía de fuerza atómica que permite obtener imágenes de contraste según la composición de la muestra, obteniendo el potencial superficial y el gradiente de capacitancia (dC/dZ) a la vez que obtiene la imagen morfológica de la muestra. Estas medidas se realizaron al aire.

En la figura 1.4.4 se presentan las imágenes obtenidas de la morfología, el potencial superficial y el gradiente de capacitancia, tomadas en la misma zona de la placa

DNPs9/MPTS/Au. En las imágenes del potencial superficial y de gradiente de capacitancia (figura 1.4.4 B y C, respectivamente) las DNPs9 presentan un mayor contraste brillo-oscuridad, por lo que se pueden distinguir de la capa de MPTS. Se observa un alto grado de conectividad entre las nanopartículas embebidas en el sol-gel, probablemente debido a su tendencia a la agregación.

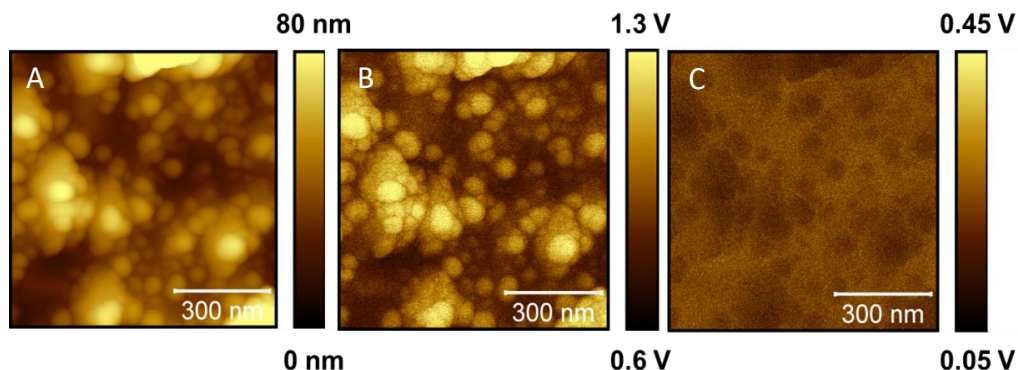


Fig. 1.4.4. Imagen AFM en modo contacto intermitente, $800 \times 800 \text{ nm}^2$, de la morfología (A), el potencial superficial (B) y el gradiente de capacitancia (C) de la placa DNPs9/MPTS/Au.

Por último, se estudió la morfología de la superficie del biosensor completo, LOx/DNPs9/MPTS/Au. En la imagen 1.4.5 se presenta la imagen de AFM obtenida en tampón fosfato, donde se pueden observar estructuras nanogranulares, asociadas a las DNPs9, y zonas más borrosas correspondientes a la red tridimensional sol-gel. También se observan estructuras más pequeñas presentes en ambas zonas, tanto alrededor de las estructuras de mayor tamaño como en las zonas más borrosas. Para poder distinguir mejor estas estructuras, se obtuvo el perfil superficial en una zona donde predomina el MPTS (inserto figura 1.4.5). La línea punteada corresponde con el perfil tomado. A lo largo de este perfil se determinaron ocho estructuras con alturas comprendidas entre 1 y 2 nm. Ya que el perfil esta tomado en una zona donde el MPTS es predominante, podemos pensar

que estas estructuras, de pequeña altura, pueden corresponder a enzimas individuales parcialmente embebidas en la red sol-gel.

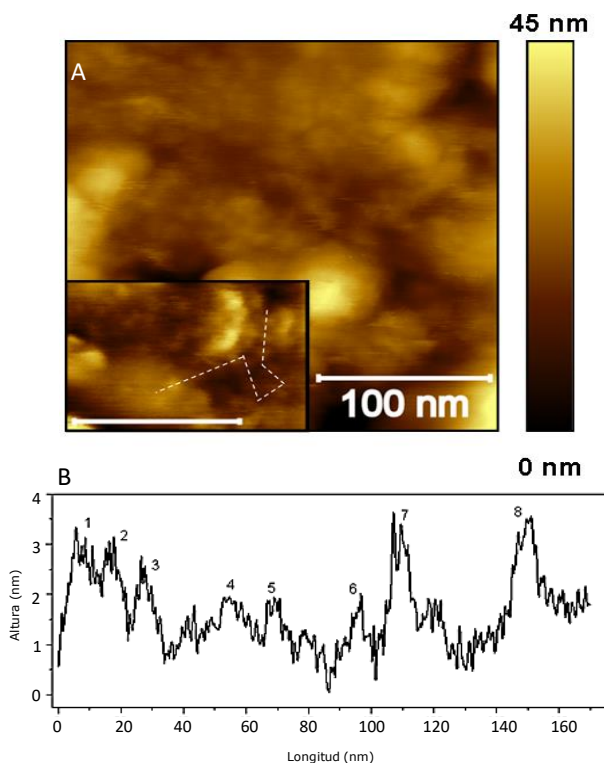


Fig. 1.4.5. Imagen AFM en modo contacto intermitente en tampón fosfato, $250 \times 250 \text{ nm}^2$ de (A) la superficie biosensora LOx/DNPs9/MPTS/Au. Inserto: imagen AFM $150 \times 105 \text{ nm}^2$ tomada en una zona donde se observan pequeñas estructuras. (B) Perfil superficial correspondiente a la línea punteada del inserto, tomada de derecha a izquierda. Cada número corresponde a una estructura.

Se obtuvieron las curvas de fuerza para cada etapa del desarrollo del biosensor, con el fin de obtener más información sobre dureza, rigidez, espesor de la capa biosensora y, por lo tanto, una mejor caracterización. En la figura 1.4.6 se presentan las curvas obtenidas de la representación de la deflexión frente a la separación entre la punta y la superficie de la muestra. La región de 0 a 10 nm, donde la deflexión es nula, corresponde con el momento en que no hay contacto entre la

punta y la superficie de la muestra, mientras que los valores negativos indican la distancia a la que puede penetrar la punta en la muestra.

Para la superficie recubierta con DNPs9/Au (—) se obtiene una línea vertical, lo que se corresponde con la presencia de un material rígido, las DNPs9, por lo que la punta no puede penetrar en la muestra. La superficie MPTS/Au (—) no presenta ninguna región con pendiente vertical, ya que se trata de un material blando y teniendo en cuenta la profundidad a la que penetra la punta, podemos decir que tiene un espesor de al menos 45 nm.

Las líneas azul y verde se tomaron en distintas zonas de la superficie DNPs9/MPTS/Au. Como se puede observar, ambas presentan primero una región curva, aproximadamente de 5 nm y 15 nm respectivamente, correspondiente a una zona blanda de la muestra. Posteriormente alcanzan una línea vertical que se corresponde con la región rígida de la muestra, las DNPs9, que aparecen a distinta profundidad, embebidas en el MPTS. La curva obtenida para la superficie del biosensor LOx/DNPs9/MPTS/Au (—) presenta prácticamente el mismo comportamiento, pero en este caso se alcanza el régimen vertical a un desplazamiento de 45 nm, lo que indica que las nanopartículas de diamante están localizadas a dicha profundidad. Lo que no podemos distinguir con este análisis es la zona blanda debida al MPTS respecto de la que corresponde a la enzima LOx. Todos estos resultados nos permiten configurar un mapa más completo de la distribución del nanomaterial y de la enzima en la capa sol-gel.

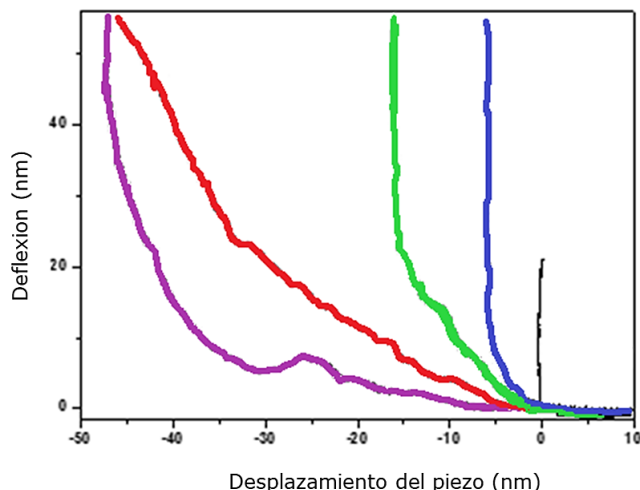


Fig. 1.4.6. Curvas de fuerza características obtenidas para las superficies DNPs9/Au (—), MPTS/Au (—), distintos puntos de DNPs/MPTS/Au (—, —) y LOx/DNPs9/MPTS/Au (—).

1.4.2.3. Caracterización del biosensor mediante EIS

Se procedió a realizar una caracterización de la superficie biosensora mediante espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) para conocer la conductividad de esta, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.9 de materiales y métodos. Las medidas se llevaron a cabo para cada etapa del desarrollo del biosensor, en una disolución $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 10 mM en tampón fosfato pH 7.0 que contiene KCl 0.1 M.

En la figura 1.4.7 se presentan los diagramas de Nyquist obtenidos para cada una de las etapas del desarrollo del biosensor. El diagrama de Nyquist se obtiene de la representación de la parte imaginaria (Z'') frente a la parte real (Z') de la impedancia, como se comentó en el apartado 3.1.4 de materiales y métodos. Como se puede observar, existen dos zonas diferenciadas, una correspondiente al control cinético, semicircular, y la otra al control difusional. La intersección con el eje real a altas frecuencias, de en torno a 10^4 Hz, corresponde a la resistencia del electrolito

(R_e). Los semicírculos se corresponden con el proceso de resistencia a la transferencia de carga a través de la interfase (R_{CT}) y su valor se calcula a partir de la diferencia entre los dos puntos de corte de la curva con el eje. La doble capa eléctrica formada en la interfase entre el electrodo y la disolución se comporta como un condensador (C) y el valor de su capacitancia se puede calcular a partir de la frecuencia en el máximo de la curva. La parte lineal, a frecuencias bajas, corresponde con el proceso difusional de los iones.

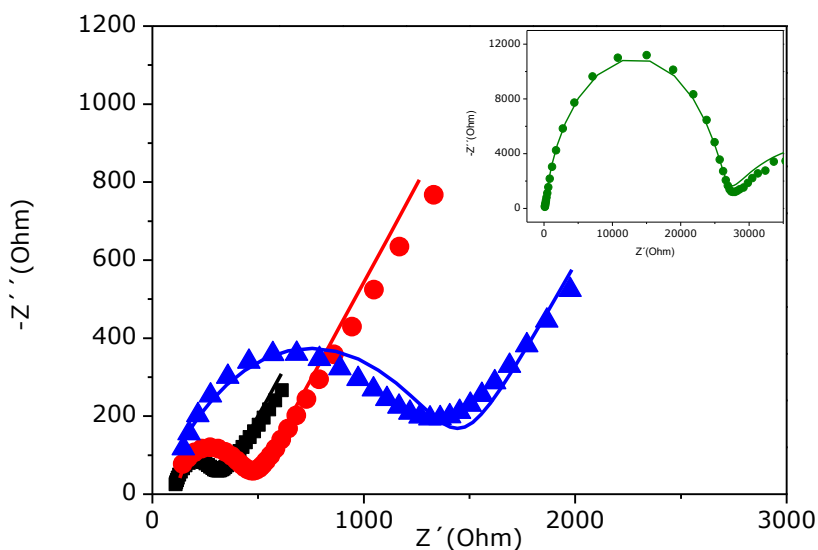


Fig. 1.4.7. Diagramas de Nyquist para el electrodo de oro sin modificar (—), el electrodo MPTS/Au (inserto —), DNPs9/MPTS/Au (—) y el biosensor LOx/DNPs9/MPTS/Au (—), obtenidos en disolución $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 10 mM, tampón fosfato pH 7.0 que contiene KCl 0.1 M. La línea sólida corresponde al ajuste de los datos experimentales.

La impedancia, oposición de un circuito al paso de corriente, es un concepto más amplio que el de la resistencia, ya que se puede aplicar a circuitos eléctricos que presentan configuraciones más complejas. Por lo tanto, los datos obtenidos en los diagramas de Nyquist se pueden ajustar a circuitos equivalentes [Randles, 1947].

Las líneas sólidas de la figura 1.4.7 representan el ajuste de los resultados experimentales a los circuitos equivalentes correspondientes para cada una de las etapas y que se presentan en la figura 1.4.8.

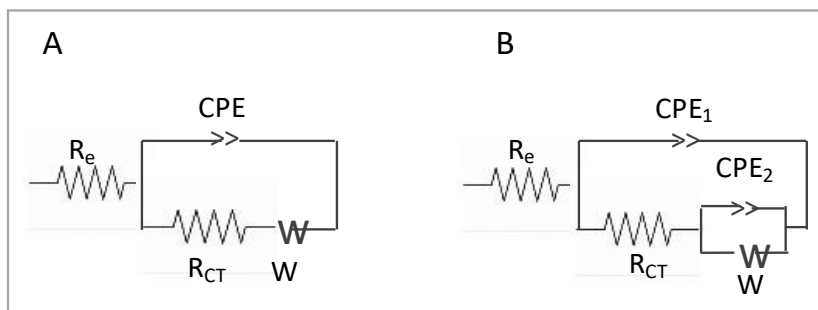


Fig. 1.4.8. Circuitos equivalentes a los que se han ajustado los datos experimentales del electrodo de oro sin modificar, el electrodo DNP9/MPTS/Au y el biosensor LOx/DNP9/MPTS/Au (A) y a los datos experimentales del electrodo MPTS/Au (B).

Para todos los electrodos modificados estudiados, el biosensor LOx/DNP9/MPTS/Au, el electrodo DNP9/MPTS/Au y el electrodo de oro sin modificar, el circuito equivalente empleado en el ajuste de los datos experimentales (figura 1.4.8 A) presenta, además de los elementos de resistencia del electrolito, R_e , y de resistencia a la transferencia de carga a través de la interfase, R_{CT} , otros elementos que tienen en cuenta la difusión de la sonda redox hasta la superficie del electrodo, la impedancia de Warburg (W), y el comportamiento no ideal de un condensador, elemento de fase constante (CPE). Este último, además, combina la capacitancia generada por la modificación de la superficie y la doble capa, teniendo en cuenta, por tanto, el grado de homogeneidad de la superficie, que viene dado por un coeficiente de idealidad (n). A valores de n más cercanos a la unidad, mayor será la homogeneidad de la superficie. El circuito equivalente que se ajusta a los datos experimentales obtenidos para el electrodo MPTS/Au (figura 1.4.8 B), presenta un segundo

elemento de fase constante (CPE_2) que se correspondería con la modificación de la superficie del electrodo con el MPTS, creando así una segunda capa. Sin embargo, este segundo elemento de fase constante no es necesario introducirlo cuando se modifica el electrodo MPTS/Au con las DNPs9 y posteriormente con la enzima. Esto puede deberse a que la inclusión de las nanopartículas de diamante facilita la transferencia de carga a través de la red sol-gel minimizando el efecto generado por una segunda capa.

En la tabla 1.4.1 se muestran tanto los valores experimentales como los obtenidos a partir de los ajustes mediante los circuitos equivalentes.

Tabla 1.4.1. Resultados experimentales y de los ajustes de los experimentos de EIS.

	Au	MPTS/Au	DNPs9/MPTS/Au	LOx/DNPs9/MPTS/Au
Resultados experimentales				
R_e (Ω)	100	183	75	43
R_{CT} (Ω)	120	264×10^2	324	1227
C (F)	3.2×10^{-6}	6.2×10^{-7}	3.8×10^{-6}	3.3×10^{-6}
τ_{CT}	0.384×10^{-3}	16.4×10^{-3}	1.23×10^{-3}	4.05×10^{-3}
Resultados de los ajustes				
R_e (Ω)	100	120	110	94.2
R_{CT} (Ω)	107	261×10^2	240	1173
CPE_1 (S sn)	3.1×10^{-6}	0.62×10^{-6}	0.3×10^{-5}	0.2×10^{-5}
n_1	0.84	0.88	0.80	0.75
CPE_2 (S sn)	-	0.90×10^{-4}	-	-
n_2	-	0.093	-	-
W (Ω)	0.92×10^{-3}	0.45×10^{-3}	0.15×10^{-2}	0.14×10^{-2}

Los resultados obtenidos del electrodo de oro sin modificar, Au, muestran una resistencia a la transferencia de carga (R_{CT}) de 120 Ω . Tras la modificación con MPTS,

este valor aumenta de forma evidente, alcanzando los 26400 Ω , debido a que la red sol-gel formada en la superficie del electrodo dificulta la transferencia electrónica. La incorporación de las nanopartículas de diamante a la red tridimensional disminuye su valor de forma significativa hasta un valor de 324 Ω , demostrando que las DNPs9 mejoran la transferencia electrónica a través del MPTS. La R_{CT} aumenta de nuevo, hasta alcanzar los 1227 Ω , para el biosensor LOx/DNPs9/MPTS/Au, debido a la inclusión de la enzima en la red tridimensional sol-gel.

De las medidas de impedancia también se pueden obtener las constantes de tiempo correspondientes a los procesos de transferencia de carga (τ_{CT}) a partir del valor de la frecuencia máxima, ω_{max} , y empleando la siguiente ecuación (ecuación 1.4.1):

$$\tau_{CT} = \frac{1}{\omega_{max}} = R_{CT} \cdot C \quad (\text{Ec. 1.4.1})$$

El valor de ω_{max} se obtiene a partir de la frecuencia donde el semicírculo dibuja un máximo midiendo en el eje de la parte imaginaria (Z''). Para esta constante se observa un comportamiento similar al obtenido para la R_{CT} (tabla 1.4.1). Se produce un gran aumento de los valores de las constantes de tiempo obtenidas para el electrodo de oro modificado con MPTS respecto del electrodo de oro sin modificar. Esto es coherente con el hecho de que la constante τ_{CT} está relacionada con la carga de la doble capa, por tanto, es lógico que aumente al modificar la superficie con la red tridimensional sol-gel. Al incorporar a dicha red las DNPs9 se aprecia una disminución del valor de la τ_{CT} , de nuevo, se pone de manifiesto el papel de las nanopartículas de diamante en la mejora de la transferencia electrónica. El valor de la constante de tiempo obtenido para el biosensor completo aumenta un poco

respecto al electrodo DNPs9/MPTS/Au debido a la inclusión de la enzima, que presenta cierto carácter aislante.

Existe una relación inversamente proporcional entre la R_{CT} y la C , como indica la ecuación 1.4.1. Si los valores de R_{CT} aumentan, los valores de capacidad, tanto de los datos experimentales como de los obtenidos del ajuste al circuito equivalente, disminuyen. Este comportamiento refleja un incremento del espesor de la capa, ya que la capacidad de un condensador es inversamente proporcional al espesor de la capa de dieléctrico entre sus placas. Como podemos observar en la tabla 1.4.1, el biosensor MPTS/Au presenta un aumento del valor de R_{CT} y una disminución del valor de C respecto al electrodo de oro sin modificar. Al introducir las nanopartículas de diamante, la R_{CT} disminuye, aumentando el valor de la capacidad, C .

Si asumimos que la reacción de transferencia electrónica se dará sólo en las zonas donde el electrodo de oro no está formando enlaces Au-Si con el material sol-gel, y que no hay contribución difusional en esa zona, se puede relacionar el valor de la transferencia de carga (R_{TC}) con el recubrimiento de MPTS, en base a la resistencia a la transferencia de carga del electrodo sin recubrir (recubrimiento cero, $\theta_{MPTS}=0$ para el electrodo sin modificar) [Finklea, 1996; Janek, 1998], empleando la siguiente ecuación:

$$\theta_{MPTS} = 1 - \frac{R_{TC}^0}{R_{TC}^{MPTS}} \quad (\text{Ec. 1.4.2})$$

R_{TC}^0 es la resistencia a la transferencia de carga del electrodo de oro sin recubrir y R_{TC}^{MPTS} la resistencia correspondiente al electrodo recubierto con MPTS. En este caso, los valores de R_{TC} obtenidos para el electrodo de oro sin modificar y para el electrodo de oro modificado con MPTS son de 120 y 26400 Ω respectivamente.

Aplicando la ecuación 1.4.2 se obtuvo un valor de recubrimiento de 0.99, por tanto, podemos decir que el recubrimiento es prácticamente completo.

Se obtuvieron también los Diagramas de Bode para cada etapa del desarrollo del biosensor (figura 1.4.9), que muestran la evolución del módulo de impedancia y el desplazamiento del ángulo de fase con la frecuencia, para las distintas etapas del desarrollo del biosensor. En la región de altas frecuencias, 10^4 - 10^3 Hz, el módulo de la impedancia corresponde a la resistencia del electrolito (R_e) para cada caso. Como se puede observar en la tabla 1.4.1, los valores de R_e varían dependiendo de la modificación del electrodo. Aunque el valor de la resistencia del electrolito no debería sufrir cambios con la modificación del electrodo, existen autores [*Sluyters-Rehbach, 1970*], que consideran el valor de R_e como una combinación de la resistencia del electrolito entre los electrodos de referencia y de trabajo y cierta contribución generada por la modificación del electrodo de trabajo, lo que justificaría dichas variaciones. Todas las curvas presentan dos pendientes, asociadas con un proceso cinético (a altas frecuencias) y a un proceso difusivo (a bajas frecuencias).

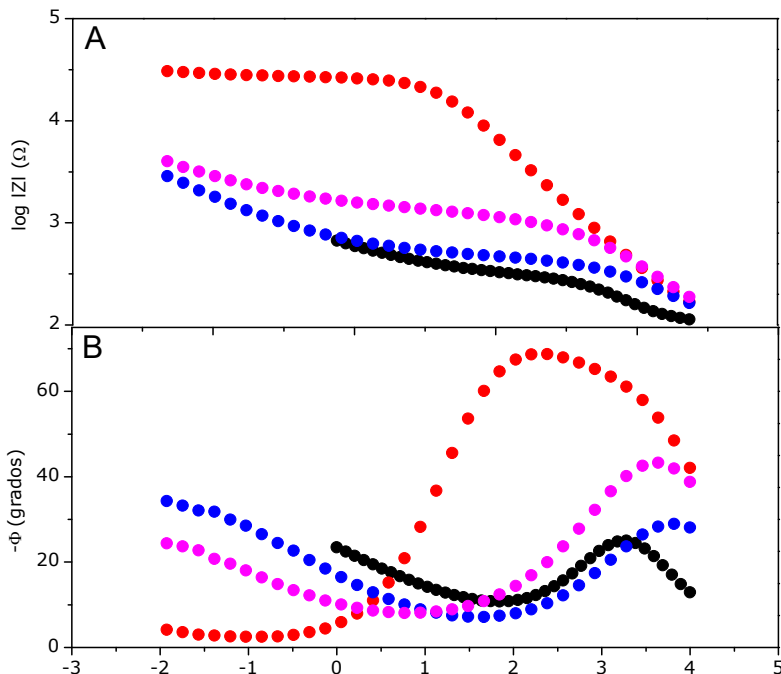


Fig. 1.4.9: Diagramas de Bode, (A) Módulo de impedancia vs. $\log(\text{frecuencia})$; (B) ángulo de fase vs. $\log(\text{frecuencia})$, para Au (—), MPTS/Au (—), DNPs9/MPTS/Au (—) y LOx/DNPs9/MPTS/Au (—) en $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 10 mM en tampón fosfato pH 7.0, conteniendo KCl 0.1 M.

En el intervalo de frecuencia de 10^4 a 10^2 Hz se observa un aumento del valor del ángulo de fase para la interfase electrolito MPTS/Au respecto del Au sin modificar, pasando de aproximadamente -25.27° a -68.92° , lo que indica un aumento del carácter capacitativo tras la modificación con el sol-gel. Este valor disminuye tras la inclusión de las nanopartículas de diamante en la red tridimensional sol-gel, hasta un valor de -28.98° , y vuelve a aumentar al modificar incluir la enzima, -43.27° . Estos resultados concuerdan con los valores de capacitancia obtenidos (C) (tabla 1.4.1), donde se produce una disminución para el electrodo de oro modificado con MPTS, un aumento al introducir las DNPs9 y, finalmente, una ligera disminución para el biosensor.

1.4.2.4. Caracterización del biosensor mediante CV

Continuando con la caracterización electroquímica del biosensor desarrollado, se obtuvieron los voltamperogramas cíclicos de las distintas etapas de su desarrollo con el fin de ver si hay respuesta catalítica y ver cómo afecta la modificación a la respuesta del electrodo. En la figura 1.4.10 se presentan los voltamperogramas obtenidos en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 en presencia de HMF 1.0 mM, utilizado como sonda redox, para las distintas etapas del desarrollo del biosensor, midiendo de -0.7 a +0.7 V a una velocidad de barrido de 100 mV s^{-1} . Para todas las etapas estudiadas se observa el par redox a +0.30 V correspondiente a la oxidación-reducción del HMF. Cuando el electrodo de oro está modificado con MPTS (—), se produce un incremento en la corriente de ambos picos, siendo mayor en el caso del pico anódico, debido a la difusión del analito dentro de la red sol-gel [Petit-Dominguez, 1997].

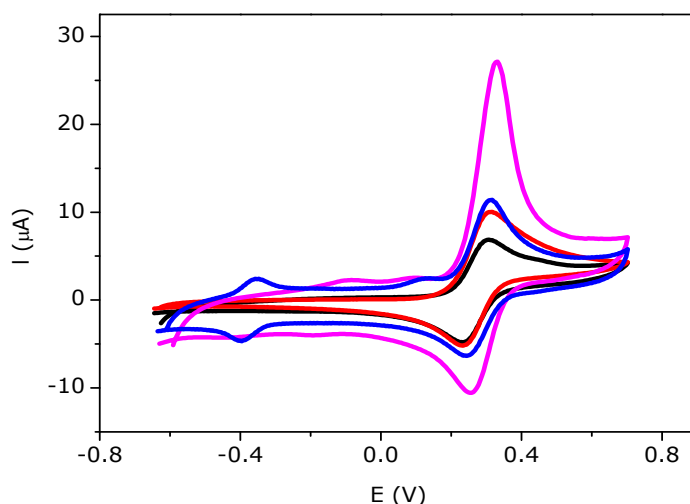


Fig. 1.4.10. Voltamperogramas cíclicos obtenidos para el electrodo de oro sin modificar (—), MPTS/Au (—), DNPs9/MPTS/Au (—) y LOx/DNPs9/MPTS/Au (—), en presencia de HMF 1.0 mM pH 7.0. Velocidad de barrido: 100 mV s^{-1} .

En un segundo paso, se emplearon DNPs9 para mejorar el transporte de carga a través de la red tridimensional. El voltamperograma correspondiente a esta etapa (—) presenta un claro aumento de los picos anódico y catódico con respecto al electrodo de oro sin modificar y modificado con MPTS. Como ya se ha comentado anteriormente, este comportamiento se debe al aumento del área superficial relativa y a los procesos de óxido-reducción que pueden sufrir las DNPs, además, las DNPs9 pueden actuar como centros conductores entre el HMF, que está difundiendo dentro sol-gel, y el electrodo [Parra-Alfambra, 2011].

El voltamperograma obtenido para el biosensor LOx/DNPs9/MPTS/Au (—) presenta el par redox a -0.40 V correspondiente a la transferencia electrónica directa entre el centro activo redox de la enzima y la superficie del electrodo, que se observaba en el caso del biosensor anteriormente descrito LOx/DNPs9/Au, y que está reportado previamente para otras enzimas inmovilizadas que contienen el mismo centro activo redox (Flavin Adenín Dinucleótido, FAD) que la enzima LOx [Wang D., 2009; Zhu L., 2013; Wooten, 2014].

Con el fin de estudiar si se reproduce este comportamiento empleando otra enzima con el mismo centro activo redox, se obtuvieron los voltamperogramas cíclicos, en las mismas condiciones, para las distintas etapas del desarrollo del biosensor modificado con GOx (GOx/DNPs9/MPTS/Au), siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.4 de materiales y métodos. Como se puede observar en la figura 1.4.11, se obtuvo la misma respuesta que la obtenida con la LOx. Por tanto, aunque el centro activo redox de LOx y GOx (FAD) está encapsulado dentro de la estructura de la proteína, lo que dificulta la transferencia directa entre la enzima y el electrodo, la presencia de las DNPs9 lo facilita.

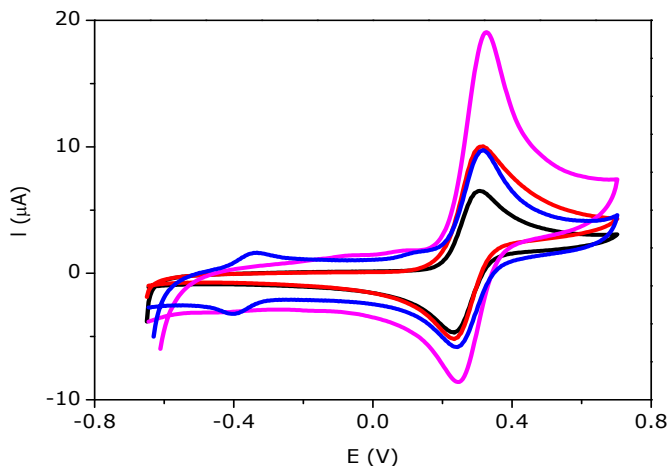


Fig. 1.4.11. Voltamperogramas cíclicos obtenidos para el electrodo de oro sin modificar (—), MPTS/Au (—), DNP9/MPTS/Au (—) y GOx/DNP9/MPTS/Au (—), en presencia de HMF 1.0 mM pH 7.0. Velocidad de barrido: 100 mV s^{-1} .

1.4.3. Respuesta del biosensor de lactato LOx/DNP9/MPTS/Au frente a adición de sustrato

Se obtuvo la respuesta del biosensor desarrollado frente a la adición de lactato empleando, como en los casos anteriores, el HMF como mediador redox en disolución. La respuesta catalítica sigue el esquema de la figura 1.2.14, igual que en los casos anteriores.

Se obtuvo la respuesta del biosensor en una disolución de tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 que contiene HMF 1.0 mM, en ausencia y en presencia de 1.0 mM de lactato, registrando el voltamperograma cíclico entre -0.2 V y +0.7 V a una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} . Como se puede observar en la figura 1.4.12, el biosensor desarrollado presenta respuesta catalítica tras la adición de sustrato.

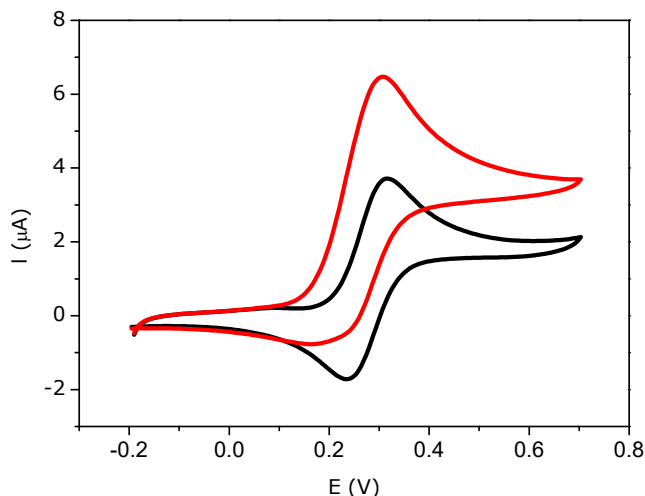


Fig. 1.4.12. Voltamperogramas cíclicos obtenidos para el biosensor LOx/DNPs9/MPTS/Au en una disolución 0.1 M de tampón fosfato pH 7.0 que contiene HMF 1.0 mM, en ausencia (—) y en presencia de 1.0 mM de lactato (—). Velocidad de barrido: 10 mV s^{-1} .

1.4.3.1. Obtención de la curva de calibrado

Una vez comprobado que el electrodo responde frente a la adición de lactato, se obtuvo la curva de calibrado a partir de los voltamperogramas obtenidos para concentraciones crecientes de lactato (figura 1.4.13).

En la figura 1.4.14 se presenta la curva de calibrado, obtenida representando la diferencia de intensidad de corriente catalítica en presencia y en ausencia de lactato, medida a $+0.30 \text{ V}$, frente a la concentración de lactato. En el inserto de la figura 1.4.14 aparece el intervalo lineal de la curva que se empleó para la determinación de las propiedades analíticas del biosensor.

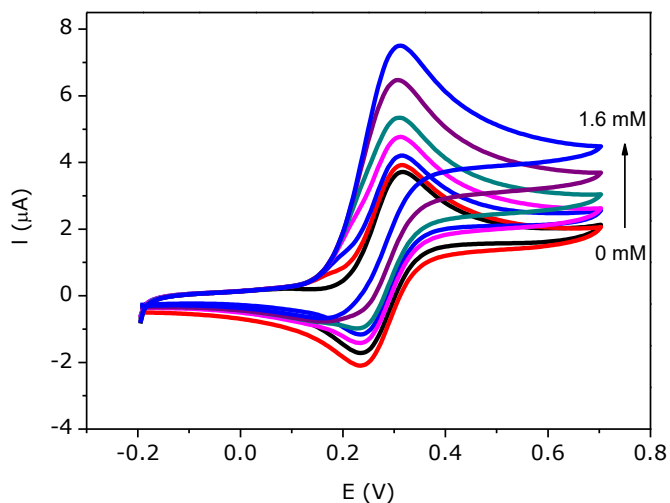


Fig. 1.4.13. Voltamperogramas cíclicos obtenidos para el biosensor LOx/DNPs9/MPTS/Au en una disolución 0.1 M de tampón fosfato pH 7.0 que contiene HMF 1.0 mM, en ausencia y en presencia de 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 1.0 y 1.6 mM de lactato. Velocidad de barrido: 10 mV s^{-1} .

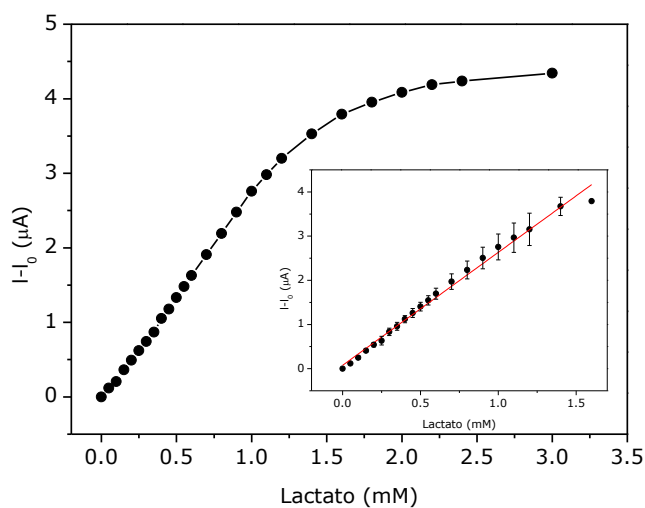


Fig. 1.4.14. Curva de calibrado para LOx/DNPs9/MPTS/Au obtenida a partir de la corriente máxima menos I_0 de los voltamperogramas obtenidos en tampón fosfato 0.1 M pH=7.0 conteniendo HMF 1.0 mM en presencia de cantidades crecientes de sustrato. Velocidad de barrido: 10 mV s^{-1} . Inserto: intervalo lineal.

1.4.3.2. Determinación de las propiedades analíticas del biosensor LOx/DNPs9/MPTS/Au

En la tabla 1.4.2 se presentan los parámetros analíticos obtenidos para el biosensor LOx/DNPs9/MPTS/Au. Como se observa, la respuesta del biosensor es lineal hasta 1.6 mM. La sensibilidad se calculó a partir de la pendiente de la curva, obteniéndose un resultado de $2.6 \mu\text{A mM}^{-1}$. El límite de detección, calculado como tres veces la desviación estándar del blanco (calculado de diez medidas) entre la sensibilidad, fue de $16 \mu\text{M}$. El límite de cuantificación, calculado como diez veces la desviación del blanco entre la sensibilidad, fue de $53 \mu\text{M}$. La reproducibilidad se evaluó como la desviación estándar relativa de tres biosensores diferentes a una concentración de 0.5 mM, obteniendo un valor de 7%. El biosensor retiene un 100% de su respuesta inicial tras 15 días de almacenamiento a 4°C y un 70% tras un mes, indicando que el biosensor basado en sol-gel tiene una excelente estabilidad de almacenaje.

Tabla 1.4.2. Propiedades analíticas del biosensor LOx/DNPs9/MPTS/Au.

	LOx/DNPs9/MPTS/Au
<i>Respuesta lineal</i>	Hasta 1.6 mM
<i>Sensibilidad ($\mu\text{A mM}^{-1}$)</i>	2.6 ± 0.3
<i>Límite de detección (μM)</i>	16
<i>Límite de cuantificación (μM)</i>	53
<i>Reproducibilidad (R.S.D.%)</i>	7
<i>Estabilidad (%) (15 días)</i>	100

Comparando la respuesta del biosensor LOx/DNPs9/MPTS/Au, con el biosensor LOx/DNPs9/Au descrito anteriormente (tabla 1.2.2), no se observa variación ni en los límites de detección ni en los de cuantificación, siendo de 16 y $53 \mu\text{M}$ respectivamente, en el primer caso, y de 15 y $50 \mu\text{M}$ en el segundo caso. Se obtuvo

una mejor sensibilidad en el caso del biosensor desarrollado mediante adsorción química, LOx/DNPs9/Au, sin embargo, los valores de estabilidad mejoran con la presencia de la matriz sol-gel en el biosensor. Tras el mismo periodo de tiempo, 15 días, el LOx/DNPs9/Au retiene el 50% de la señal mientras que LOx/DNPs9/MPTS/Au retiene un 100% de la señal. Estos resultados confirman que la encapsulación de la enzima en una red tridimensional tipo sol-gel permite preservar su actividad catalítica y evita su pérdida en la disolución.

Las propiedades analíticas obtenidas para el biosensor LOx/DNPs9/MPTS/Au también son comparables con las obtenidas por otros biosensores de lactato que incluyen nanomateriales (tabla 1.2.3) [Parra-Alfambra, 2006a; Parra-Alfambra, 2011; Casero, 2013].

Además, el límite de detección obtenido es comparable también con los que presentan kits enzimáticos comerciales que se emplean para la determinación de lactato, (tabla 1.4.3).

Tabla 1.4.3. Comparación del límite de detección (en mg L⁻¹) obtenido para el biosensor LOx/DNPs9/MPTS/Au con respecto a otros métodos de determinación de lactato (kits enzimáticos comerciales).

Métodos para la determinación de lactato	LD (mg L ⁻¹)
Biosensor LOx/DNPs9/MPTS/Au	1.4
Kit enzimático Biosystems	20
Kit enzimático Boehringer Mannheim	0.3
Kit enzimático Megazyme	0.21

Con el fin de evaluar la estabilidad de la señal, se tomaron sucesivos voltamperogramas del biosensor LOx/DNPs9/MPTS/Au en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0 conteniendo 1 mM de HMF en presencia de 0.7 mM de lactato (figura

1.4.15). De estas medidas se puede concluir que, tras 100 barridos, se mantiene aproximadamente el 92% de la señal inicial.

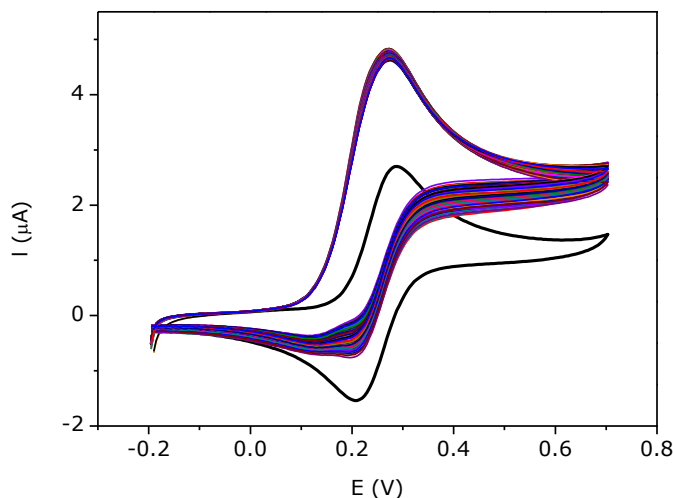


Fig. 1.4.15. Sucesivos voltamperogramas obtenidos para el biosensor LOx/DNPs9/MPTS/Au en tampón fosfato 0.1 M conteniendo HMF 1.0 mM en presencia de 0.7 mM de lactato. Velocidad de barrido 10 mV s^{-1} .

Para poner de manifiesto el efecto que tiene en la respuesta catalítica la inclusión de las DNPs9 en la estructura tridimensional sol-gel, se modificó un electrodo de oro con MPTS y la enzima LOx, pero sin DNPs9 (LOx/MPTS/Au), siguiendo el mismo procedimiento, y se obtuvo su respuesta frente a adición de lactato. En la figura 1.4.16 se presenta la curva de calibrado obtenida para LOx/MPTS/Au.

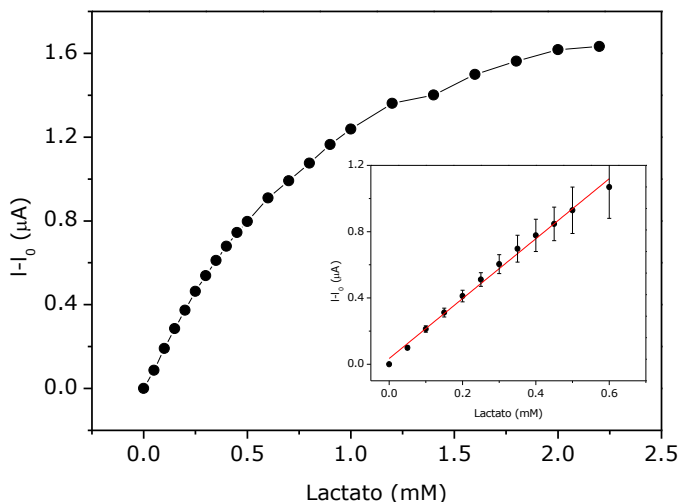


Fig. 1.4.16. Curva de calibrado obtenida para LOx/MPTS/Au obtenida a partir de la corriente máxima menos I_0 de los voltamperogramas obtenidos en tampón fosfato 0.1 M pH=7.0 conteniendo HMF 1.0 mM en presencia de cantidades crecientes de lactato. Velocidad de barrido: 10 mV s^{-1} . Inserto: intervalo lineal.

Del intervalo lineal de curva se obtuvieron los parámetros analíticos correspondientes a LOx/MPTS/Au, que se presentan en la tabla 1.4.3, calculados de la misma forma que en el caso anterior, de la media de tres biosensores. Al comparar los parámetros obtenidos para ambos biosensores, LOx/MPTS/Au y LOx/DNPs9/MPTS/Au se puede comprobar como la inclusión de las DNPs9 en el diseño del biosensor mejora tanto la respuesta lineal como los límites de detección y cuantificación. La reproducibilidad obtenida es buena en ambos casos.

Tabla 1.4.3. Propiedades analíticas del biosensor LOx/MPTS/Au.

	LOx/MPTS/Au
<i>Respuesta lineal</i>	Hasta 0.6 mM
<i>Sensibilidad ($\mu\text{A mM}^{-1}$)</i>	1.5 ± 0.2
<i>Límite de detección (μM)</i>	69
<i>Límite de cuantificación (μM)</i>	230
<i>Reproducibilidad (R.S.D %)</i>	2

1.4.4. Cálculo de los parámetros cinéticos del biosensor de lactato LOx/DNPs9/MPTS/Au

Se calculó el coeficiente de Hill (X) para evaluar el ajuste de la respuesta del biosensor LOx/DNPs9/MPTS/Au, obtenida mediante voltamperometría cíclica, al modelo de Michaelis-Menten, empleando la ecuación 1.2.5. De la representación del $\log ((i_{\max}/i)-1)$ frente al $\log [\text{lactato}]$ (figura 1.4.17) se obtiene una recta de cuya pendiente, cambiada de signo, se obtuvo el valor del coeficiente de Hill. El valor obtenido, $X = 1.36$, es cercano a la unidad, por lo que podemos decir que la respuesta del biosensor se ajusta al modelo de Michaelis-Menten.

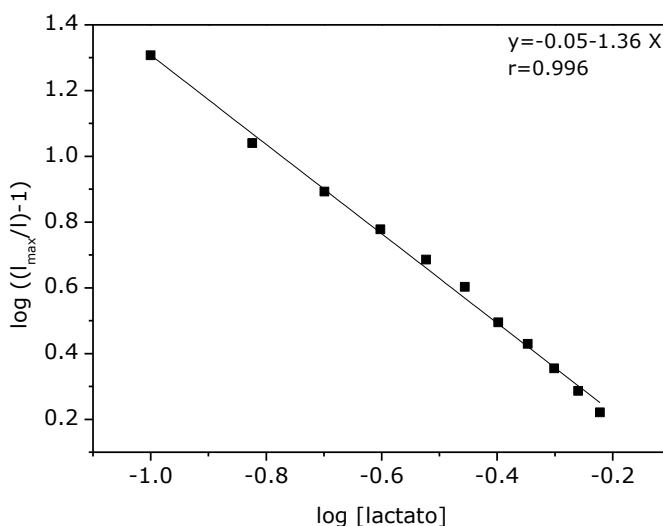


Fig. 1.4.17. Representaciones de la ecuación de Hill obtenida para el biosensor LOx/DNPs9/MPTS/Au midiendo la intensidad a +0.30V.

Empleando la representación de Lineweaver-Burk [Lineweaver, 1934], ecuación 1.2.6, se calcularon los valores de K_M y V_{\max} para el biosensor. La figura 1.4.18 muestra la gráfica obtenida al representar la inversa de la intensidad de corriente máxima frente a la inversa de la concentración de sustrato.

El corte de la recta con el eje de ordenadas representa $1/V_{\max}$, y el punto de corte con el eje de abscisas representa $-1/K_M$. Se obtuvo un valor de V_{\max} de $9.59 \mu\text{A}$ y de K_M 0.48 mM . Estos resultados son comparables con los obtenidos para los biosensores anteriormente descritos, LOx/DNPs9/Au y LOx/DNPs4/Au, y para los descritos en la bibliografía [Iwuoha, 1999; Suman, 2005; Zanini, 2010].

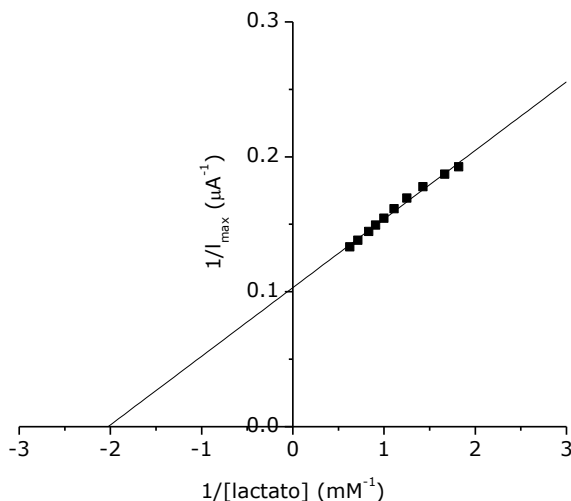


Fig. 1.4.18. Representación de Lineweaver-Burk obtenida para el biosensor LOx/DNPs9/MPTS/Au.

1.4.5. Aplicación del biosensor LOx/DNPs9/MPTS/Au a la determinación de lactato en muestras reales

1.4.5.1. Determinación de lactato en vino blanco

Con el fin de demostrar la aplicabilidad del biosensor desarrollado se analizó el ácido láctico en muestra real, vino blanco, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.10 de materiales y métodos. Se empleó el método de adición estándar con el fin de minimizar los efectos de la matriz. Como tratamiento previo sólo se realizó una dilución de la muestra (1:5, en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0)

para ajustarla al intervalo lineal. De la media de tres biosensores se obtuvo la concentración de lactato en la muestra. Se obtuvo un valor de $0.52 \pm 0.03 \text{ g L}^{-1}$. Empleando el kit comercial, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.11 materiales y métodos y tratando de la misma manera la muestra, se obtuvo un valor muy similar al obtenido con el biosensor desarrollado, $0.54 \pm 0.02 \text{ g L}^{-1}$, por lo que podemos decir que es apropiado para la determinación de lactato en vino.

Tabla 1.4.5. Datos obtenidos en la determinación de L-lactato en vino blanco con el biosensor LOx/DNPs9/MPTS/Au y con un kit enzimático comercial.

Muestra	LOx/DNPs9/MPTS/Au Contenido lactato (g L^{-1})	Kit enzimatico Contenido lactato (g L^{-1})
Vino blanco	0.52 ± 0.03	0.54 ± 0.02

1.4.5.2. Determinación de lactato en suero

En la tabla 1.4.6 se presentan los valores de concentración de lactato obtenidos para una muestra de suero humano comercial. Las medidas se realizaron empleando el biosensor LOx/DNPs9/MPTS/Au desarrollado y un kit enzimático comercial con el objetivo de comparar los resultados, empleando el método de adición estándar. En ambos casos, previo a la determinación, se sometió a la muestra a una desproteinización según se describe en el apartado 4.10 de materiales y métodos. la concentración de lactato de obtuvo de la media de tres medidas. Como se puede observar en la tabla 1.4.6 se obtuvieron unos valores de $0.07 \pm 0.06 \text{ g L}^{-1}$ con el biosensor desarrollado y de $0.08 \pm 0.02 \text{ g L}^{-1}$ mediante el kit enzimático. Los valores obtenidos por ambos métodos son comparables, confirmando la aplicabilidad del biosensor desarrollado.

Tabla 1.4.6. Datos obtenidos en la determinación de lactato en suero con el biosensor LOx/DNPs9/MPTS/Au y con un kit enzimático comercial.

Muestra	LOx/DNPs9/MPTS/Au Contenido lactato (g L^{-1})	Kit enzimatico Contenido lactato (g L^{-1})
Suero	0.07 ± 0.06	0.08 ± 0.02

CAPÍTULO 2

MÉTODO ÓPTICO BASADO EN NANOHILOS DE ZnO PARA LA DETECCIÓN DE LACTATO

El ZnO es un semiconductor tipo-n con un salto de banda de 3.3 eV, un punto isoeléctrico alto, de 9.5, y que presenta fotoluminiscencia a temperatura ambiente [Liu T., 2006; Kim K., 2012; Zhao D., 2013; Klaumünzer, 2013; Viter, 2014; Chaaya, 2014b; Sodzel, 2015; Sarangi, 2015; Politi, 2015; Elhag, 2015; Viter, 2015a; Viter, 2015b]. Gracias a sus propiedades, el ZnO se ha empleado en distintas aplicaciones, como el desarrollo de sistemas piezoeléctricos [Cimpoiasu, 1996], láseres UV [Museum, 2010], detectores UV [Wang W., 2009], etc. Su biocompatibilidad y sus propiedades físicas han permitido también el uso de películas y nanoestructuras de ZnO en el campo de la salud, en el desarrollo de biosensores [Singh, 2007], liberación de fármacos [Yuan, 2010], bioimagen [Wu, 2007] y tratamientos contra el cáncer [Hanley, 2008]. Posee un elevado punto isoeléctrico. Esta propiedad permite que biomoléculas con menor punto isoeléctrico puedan ser inmovilizadas sobre el ZnO sin necesidad de tratamientos químicos. Además, la buena biocompatibilidad que presenta el ZnO impide la desnaturalización de la proteína inmovilizada, conservando su estructura secundaria [Topoglidis, 2001; Krishnamoorthy, 2006]. Así, se encuentran en la bibliografía trabajos en los que se emplean nanoestructuras de ZnO, al igual que otros nanomateriales, para nanoestructurar la superficie de los electrodos con el fin de desarrollar sensores sensibles para la determinación de biomoléculas como glucosa, colesterol, ADN, etc. [Wei A., 2006; Singh, 2007; Saha, 2009; Saha, 2011].

Sin embargo, hasta el momento no se han explotado mucho las propiedades fotoluminiscentes para el desarrollo de métodos de detección de estas biomoléculas, al igual que se ha hecho con otros nanomateriales [Steiner, 2011; Wilhelm, 2014]. En estos casos los métodos adolecen de falta de selectividad, para dotarlos de ella muchas veces se requiere la funcionalización del nanomaterial con una capa biosensible, por ejemplo, una enzima [Yakimova, 2012; Sodzel, 2015].

En concreto, la fotoluminiscencia (PL) que presentan las nanoestructuras de los óxidos metálicos está bastante bien estudiada, y permite asociar ciertas bandas del espectro PL a defectos concretos, de forma relativamente sencilla. Del cambio en las bandas de luminiscencia, obtenidas como resultado de una reacción biológica acoplada a la nanoestructura, se puede concluir qué defectos del nanomaterial actúan como centros de absorción y trabajar en ellos para mejorar el nanomaterial. Estos métodos están basados en los cambios en la PL del nanomaterial antes y después de la inmovilización de la biomolécula, así como tras la interacción con el analito. En este sentido, Viter y col. han desarrollado un método basado en la PL de nanopartículas de TiO_2 para el diagnóstico de leucosis retroviral, mediante la formación de una capa de bioreconocimiento por inmovilización del correspondiente antígeno sobre las nanopartículas de TiO_2 [Viter, 2012], obteniendo buenos resultados en cuanto a la sensibilidad y selectividad. También se ha utilizado la PL de nanovarillas de ZnO para la detección de *Salmonella* [Viter, 2014]. En este caso, Viter y col., determinaron que las vacantes de oxígeno del ZnO actúan como centros de absorción, formando puentes con las biomoléculas a través de sus ácidos fosfórico y grupos carboxilato. En el caso de las nanopartículas de ZnO , también se han empleado para la monitorización de H_2O_2 producido en la reacción enzimática catalizada por la GOx y la detección de glucosa [Sodzel, 2015]. Estos trabajos ponen de manifiesto que los métodos basados en la PL de los nanomateriales se pueden considerar como métodos sensibles y selectivos para la detección de biomoléculas [Tereshchenko, 2016].

Por ello, en este trabajo se ha combinado la luminiscencia de nanoestructuras de ZnO con la selectividad de la enzima LOx para la puesta a punto de un método luminiscente para la determinación de lactato.

2.1. Método de síntesis de los nanohilos de ZnO (ZnO NWs)

En primer lugar, para realizar este trabajo se llevó a cabo la síntesis de los nanohilos de ZnO. Esta se realizó en el grupo de investigación del profesor José Luis Pau, empleando la técnica de Transporte Químico de Vapores (CVT), siguiendo el proceso descrito en el apartado 1.2 de materiales y métodos. Este método consta, básicamente, de tres pasos. En el primero, se produce la evaporación térmica de los precursores sólidos, posteriormente, el vapor generado es transportado mediante un gas y, finalmente, se produce la cristalización del vapor en la zona de condensación. El sólido obtenido puede formar distintas nanoestructuras además de nanohilos crecidos sobre un sustrato, como por ejemplo estructuras tipo tetrápodo [Dai, 2002] y, además, ZnO en polvo. Para hacer crecer los nanohilos sobre el sustrato, en este caso silicio, este se modificó previamente con una capa de Zn, que actúa proporcionando centros de nucleación. El sustrato modificado (Zn/Si) se coloca en la zona de condensación, según el esquema presentado en la figura I6 de la Introducción. El proceso CVT permite controlar la morfología y la densidad de los nanohilos controlando parámetros del proceso como la temperatura, la composición y flujo del gas, etc. En este caso se empleó como precursor sólido una mezcla ZnO/C (1:1). La temperatura en la zona de evaporación fue de 900°C, bajo un flujo de Ar (g) de 100 sscm. Se suministró un flujo de O₂ (g) de 100 sscm, manteniendo el flujo de Ar constante, durante 30 minutos. Se realizó el estudio morfológico de los nanohilos obtenidos empleando estas condiciones mediante SEM. En la figura 2.1 se presentan las imágenes obtenidas, donde se puede observar el crecimiento vertical de los nanohilos. Estos presentan un diámetro de entre 90 a 870 nm y una longitud de aproximadamente 10.5 μm [García, 2015].

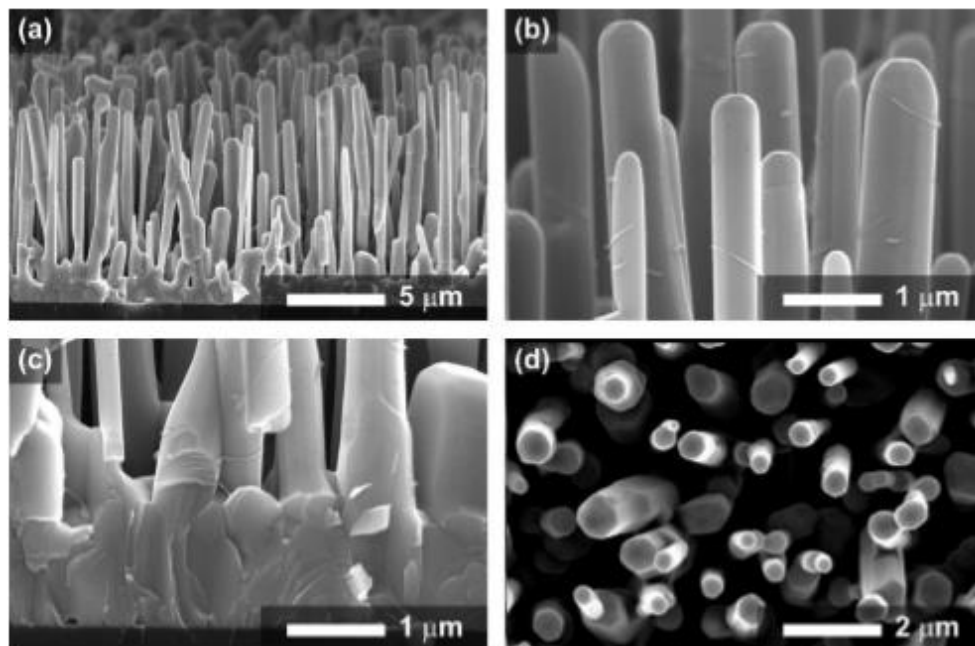


Fig. 2.1. Imágenes de SEM de los ZnO NWs crecidos sobre Si: crecimiento vertical (a), parte final de los nanohilos (b) base de los NWs, (c) imagen vista desde arriba de los nanohilos (d). Imagen tomada de [García, 2015].

Uno de los estudios realizados para la optimización de la síntesis de los nanohilos fue la influencia del tiempo de aplicación del flujo de O_2 en el crecimiento de los nanohilos. Para ello se emplearon las mismas condiciones que en el caso anterior, pero se suministro un flujo de O_2 durante 1, 3 y 6 horas. Como se puede ver en la figura 2.2, tras 1 hora, los nanohilos siguen manteniendo su verticalidad con respecto al sustrato y aumentan su longitud hasta unos 20 μm , sin embargo, al aumentar el tiempo de exposición al O_2 , se forman redes de nanohilos, sin ninguna orientación definida [García, 2015]. Por tanto, efectivamente, el control de los parámetros del proceso permite obtener nanohilos con diferentes características.

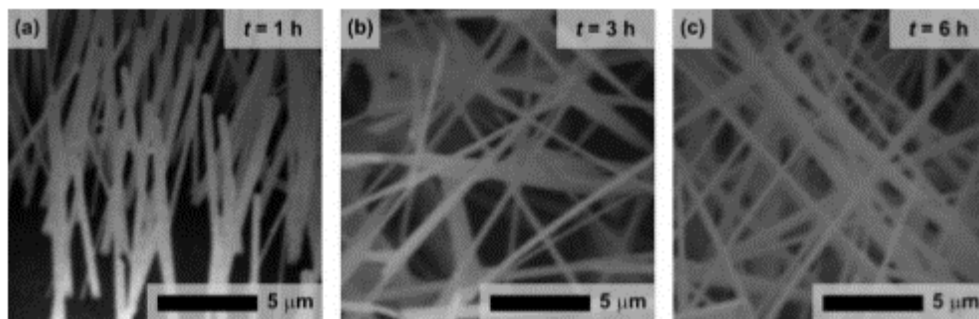


Fig. 2.2. Imágenes SEM de los ZnO NWs crecidos mediante CVT a diferentes tiempos: 1 h (a), 3 h (b) y 6 h (c). Imagen tomada de [García, 2015].

Mediante el procedimiento utilizado (CVT) no sólo se obtienen nanohilos de ZnO crecidos sobre el sustrato, sino que también se produce la reacción del Zn (I) con el O_2 ambiental, generando ZnO en polvo, que queda depositado en el tubo de cuarzo donde se lleva a cabo el proceso. Una vez obtenido el nanomaterial se procedió a su caracterización mediante diversas técnicas.

2.2. Caracterización de los ZnO NWs sintetizados

2.2.1. Caracterización morfológica mediante microscopía óptica

Los nanohilos del ZnO sintetizados se caracterizaron morfológicamente mediante microscopía óptica. En la figura 2.3 se presentan las imágenes obtenidas de una dispersión del nanomaterial a distintos aumentos, 20x (figura 2.3 A) y 100x (figura 2.3 B). En la figura 2.3 A se pueden observar, junto con nanohilos aislados, cúmulos formados por grupos de nanohilos entremezclados. Además, se observan otro tipo de nanoestructuras, como tipo tetrápodo, y algunos fragmentos de nanohilos de menor tamaño, indicando que la muestra de partida presenta cierta

heterogeneidad. En la figura 2.3 B se muestran algunos de los nanohilos aislados, de entre 20-35 μm de longitud y de un grosor estimado de unos 20 a 40 nm.

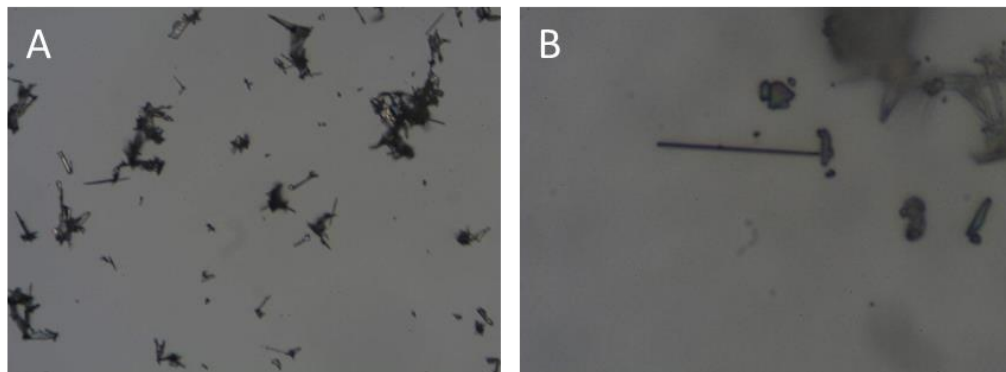


Fig. 2.3. Imagen de una dispersión de ZnO NWs tomada en un microscopio óptico con un aumento 20x (A) y un aumento 100x (B).

2.2.2. Caracterización morfológica mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se obtuvieron también las imágenes SEM de la dispersión de ZnO NWs sobre una placa de mica, mostradas en la figura 2.4. Al igual que en las imágenes obtenidas mediante microscopía óptica, la muestra presenta nanohilos aislados (figura 2.4. C y D) o formando agregados (Figura 2.4 A y B).

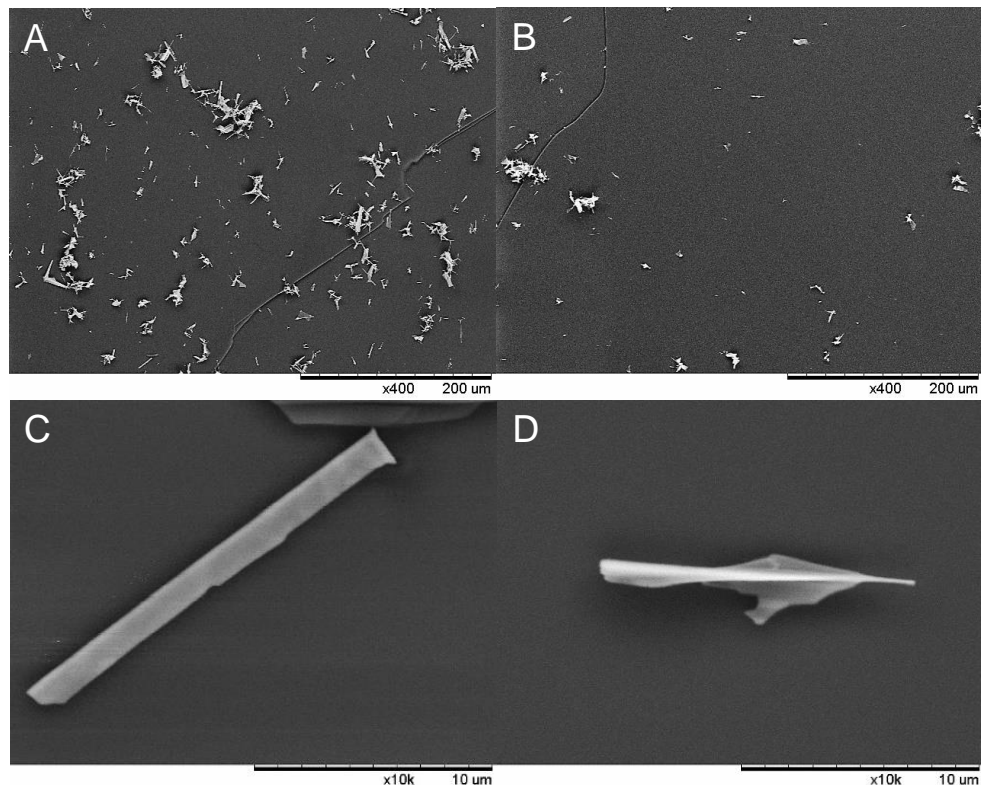


Fig. 2.4. Imagen SEM en distintos puntos de una placa de mica modificada con una dispersión de ZnO NWs 1 mg mL^{-1} tomada a 400x (A y B) y a 10000x (C y D).

2.2.3. Caracterización mediante espectroscopía de absorción UV visible

En la figura 2.5 se presenta el espectro de absorción UV visible de una dispersión de ZnO NWs en tampón fosfato pH 7.0. Se observa una banda, aunque no muy intensa, a 373 nm, que concuerda con la descrita en la bibliografía para el ZnO [Kulkarni, 2015]. Debido a sus dimensiones nanométricas, los ZnO NWs presentan un desplazamiento del pico de absorbancia hacia el azul respecto al que presenta el ZnO macroscópico, que aparece a aproximadamente 386 nm a temperatura ambiente [Mishra, 2012].

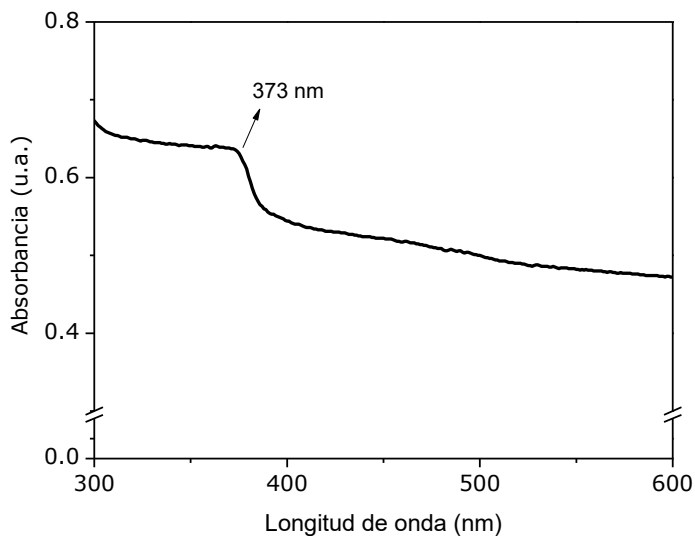


Fig. 2.5. Espectro UV visible de los ZnO NWs 0.5 mg mL^{-1} en tampón fosfato pH 7.0.

2.2.4. Caracterización mediante espectroscopía de fluorescencia

Al reducir su tamaño a escala nanométrica, las propiedades físicas de los materiales semiconductores cambian, es lo que se conoce como efectos cuánticos del tamaño. En concreto, el efecto de confinamiento cuántico aumenta la energía del salto de banda del ZnO, lo que afecta a su fotoluminiscencia [Wang X., 2004]. La fotoluminiscencia se origina de la recombinación de los estados energéticos superficiales. Una intensidad PL elevada implica que los estados superficiales permanecen poco profundos, ya que el rendimiento cuántico decrece exponencialmente al aumentar la profundidad de los estados energéticos superficiales [Chestnoy, 1986; Heath, 1998].

Para estudiar las propiedades fotoluminiscentes de los ZnO NWs sintetizados, en primer lugar, se obtuvo el espectro PL de una dispersión ZnO NWs en concentración 0.5 mg mL^{-1} en tampón fosfato de pH 7.0, a temperatura ambiente. Se utilizaron distintas longitudes de onda de excitación (310, 330, y 350 nm) con el fin de

determinar la más adecuada, obteniéndose los espectros que se presentan en la figura 2.6. La longitud de onda de excitación más adecuada, en función del espectro de emisión obtenido, fue la de 330 nm. El espectro de emisión del nanomaterial de ZnO sintetizado presenta dos picos, uno estrecho e intenso alrededor de 384 nm y uno ancho a 520 nm. El primer pico es el llamado de emisión de banda cercana (NBE) y se debe a la recombinación radiativa de los portadores de carga, es decir, los electrones y los huecos, en las bandas de conducción y valencia respectivamente. El otro pico, denominado de emisión de centros profundos (DLE), aparece en torno a 520 nm, en la región correspondiente al verde, y se atribuye a la presencia de vacantes de oxígeno [Williams G., 2009]. La emisión a 520 nm se genera por la recombinación de un hueco, generado al aplicar la radiación a 330 nm, con un electrón que ocupa la vacante de oxígeno [Huang M.H., 2001; Zhou, 2007]. Las propiedades estructurales, ópticas y eléctricas de las nanoestructuras de ZnO están muy interrelacionadas [Sodzel, 2015], por lo que, normalmente, la relación entre los valores NBE y DLE aumenta cuando mejora su estequiometría, es decir, cuando disminuyen los defectos por vacantes de oxígeno [Liao, 2008].

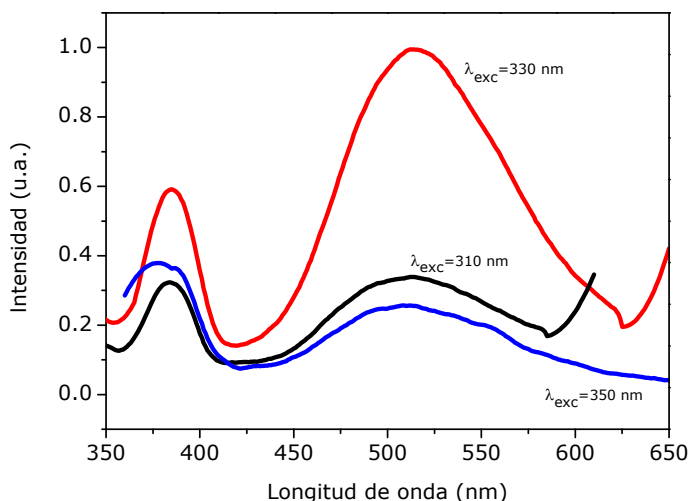


Fig. 2.6. Espectros PL de una dispersión de ZnO NWs 0.5 mg mL^{-1} en tampón fosfato pH 7.0 a λ_{exc} de 310 nm (—) 330 nm (—) y 350 nm (—).

Una vez seleccionada la longitud de onda de excitación adecuada para la obtención de los espectros de emisión de los ZnO NWs, se obtuvo el espectro PL de distintas dispersiones de los ZnO NWs conteniendo distintas concentraciones (0.01 , 0.02 , 0.05 , 0.1 , 0.2 , 0.3 , 0.5 y 1 mg mL^{-1}) con el fin de optimizar la concentración de nanohilos en la dispersión. De los espectros obtenidos se determinó 0.5 mg mL^{-1} como la concentración más adecuada.

2.2.5. Caracterización mediante espectroscopía Raman

Una de las técnicas más empleadas en la caracterización de materiales es la espectroscopía Raman. Esta técnica se basa en la dispersión inelástica de una luz monocromática y permite obtener información sobre los modos vibracionales y rotacionales del material. El ZnO tiene estructura tipo wurtzita (figura 2.7) y pertenece al grupo espacial P63mc, por lo tanto, presenta distintos modos de vibración, que se presentan en la figura 2.8 [Marquina, 2007]

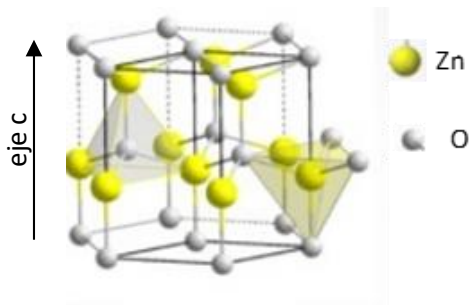


Fig. 2.7. Estructura cristalina tipo wurtzita del ZnO [Zhang Y., 2012].

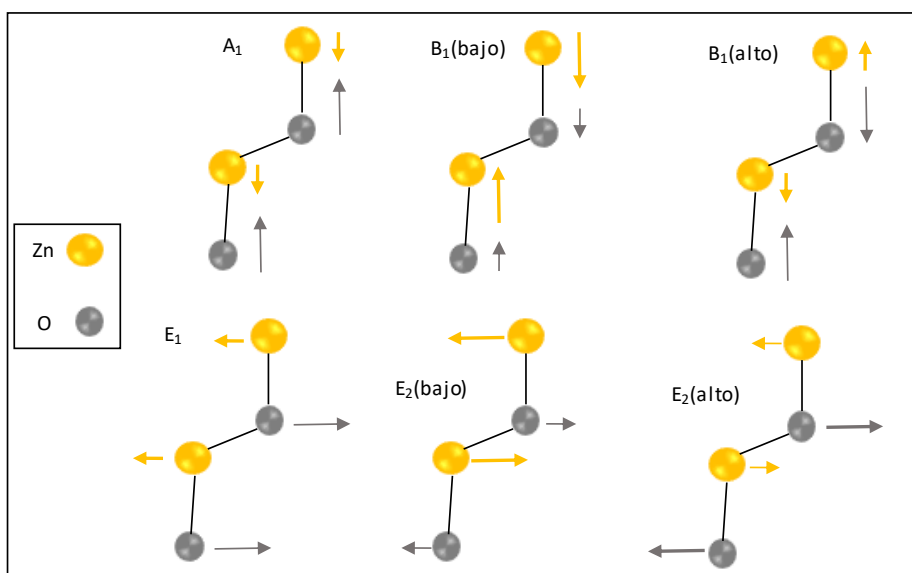


Fig. 2.8. Modos de vibración ópticos de fonones en estructura ZnO wurtzita.

Dependiendo del efecto polarizante de cada modo vibracional, estos serán o no activos en Raman. En este caso, los modos A y B, son desplazamientos en el eje c y, mientras el modo A_1 genera polarización, los modos B no inducen ningún tipo de polarización, por lo que no son activos en Raman. Por otro lado, los modos E, cuyos desplazamientos atómicos son perpendiculares al eje c son, en los tres casos, activos en Raman [Marquina, 2007].

Además, los modos A_1 y E_1 se dividen en fonones ópticos transversales (TO) y fonones ópticos longitudinales (LO). El modo E_2 por su parte, presenta dos longitudes de onda, $E_2(\text{bajo})$ y $E_2(\text{alto})$, asociados al movimiento relativo entre los átomos de O y Zn de la red cristalina. El modo $E_2(\text{alto})$ es característico de nanoestructuras del ZnO tipo nanohilos y nanotubos, indicando una buena cristalinidad [Arguello, 1969].

Se obtuvieron los espectros Raman de una muestra de nanohilos de ZnO alineados verticalmente sobre una placa de silicio, sintetizados siguiendo el proceso descrito anteriormente. Los espectros se registraron en modo retrodispersión, empleando un láser de longitud de onda 532 nm, y una potencia de 200 mW. Empleando esta configuración de medida, los modos E_2 , $A_1(\text{TO})$ y $E_1(\text{TO})$ están permitidos, ya que la radiación incidente es perpendicular a la muestra, mientras que los modos $A_1(\text{LO})$ y $E_1(\text{LO})$ sólo estarán permitidos cuando la radiación sea paralela a ella [Decremps, 2002].

En la figura 2.9 se presenta el espectro Raman obtenido. Se puede observar un pico predominante a 438 cm^{-1} correspondiente al modo $E_2(\text{alto})$. También se observa el pico correspondiente al modo $E_2(\text{bajo})$, y, menos intenso los dos modos E_2 a 325 cm^{-1} . El pico a 380 cm^{-1} se asigna al modo $A_1(\text{TO})$ y el pico a 513 cm^{-1} al modo $E_1(\text{LO})$. En este caso, el modo $E_1(\text{LO})$ no debería observarse, como se ha comentado anteriormente, por la configuración en la que se realizó la medida. Sin embargo, aunque los nanohilos de ZnO esta orientados verticalmente con respecto al soporte, algunos pueden presentar ligeras desviaciones de la verticalidad, por lo que los modos prohibidos pueden ser visibles, lo que indica que la radiación incidente no está totalmete alineada con el eje vertical del nanohilo. Además, la presencia de modo $E_1(\text{LO})$ se asocia a la presencia de vacantes de oxígeno y Zn intersticial en la estructura del ZnO [Arguello, 1969].

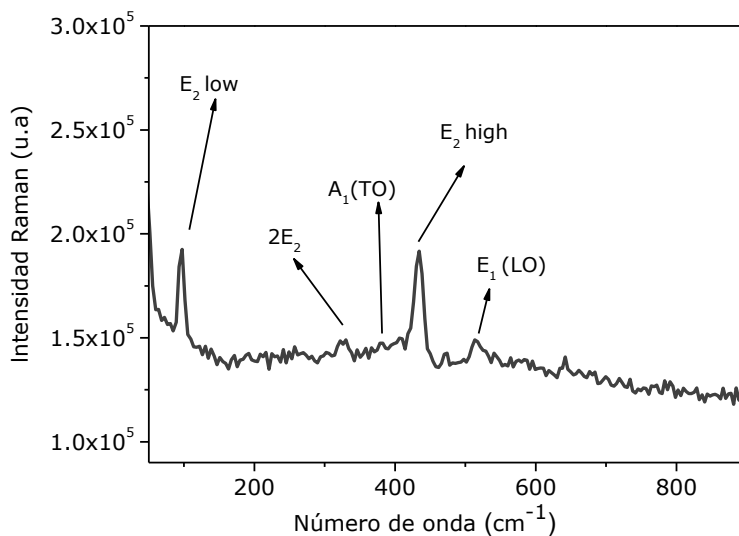


Fig. 2.9. Espectros Raman de los ZnO NWs en tampón fosfato pH 7.0.

2.2.6. Estudio de la estabilidad de la fluorescencia de los ZnO NWs

Se estudió la estabilidad de la señal PL de una dispersión de ZnO NWs en tampón fosfato pH 7.0 registrando los espectros de emisión de la misma dispersión a distintos tiempos (0, 20 minutos, 40 minutos, 2 horas, 4 horas y 24 horas), agitando justo antes de realizar la medida, y empleando una longitud de onda de excitación de 330 nm. Como se puede observar en la figura 2.10 A, la intensidad PL de la dispersión disminuye notablemente tras 20 minutos y sigue disminuyendo, aunque en menor medida, durante las primeras 5 horas. La figura 2.10 B muestra la evolución de la intensidad PL frente al tiempo. En base a estos resultados las medidas de fluorescencia se realizaron nada más preparar la dispersión ($t=0$).

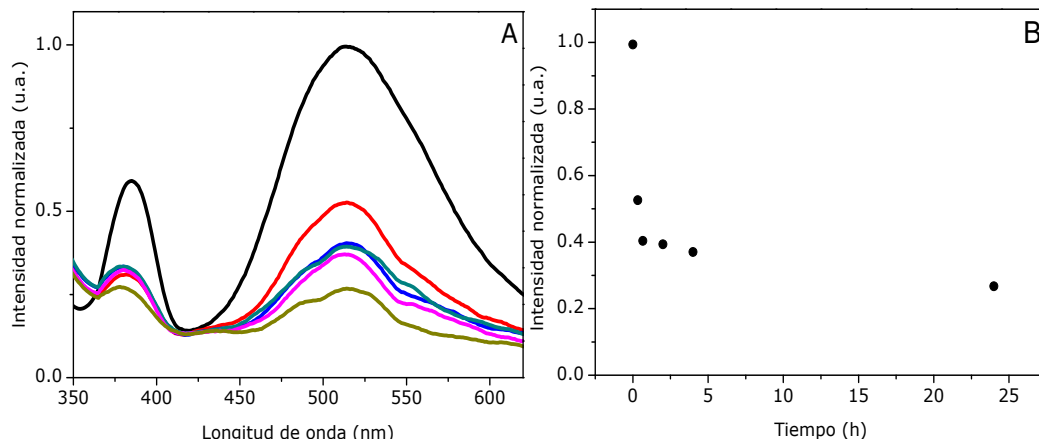


Fig. 2.10. Espectro PL de una dispersión de ZnO NWs 0.5 mg mL^{-1} en tampón fosfato pH 7.0 a tiempo 0 (—), 20 minutos (—), 40 min (—), 2 horas (—), 4 h (—) y 24 h (—), $\lambda_{\text{exc}} = 330 \text{ nm}$ (A). Variación de la intensidad PL de ZnO NWs frente al tiempo (B).

2.3. Formación del bioconjugado ZnO NWs-LOx

2.3.1. Estudio de la interacción de los ZnO NWs con la enzima (LOx)

Una vez caracterizado el nanomaterial se procedió a estudiar su interacción con la enzima lactato oxidasa (LOx). Para este estudio se utilizó, en primer lugar, la espectroscopía UV-visible. Se realizó una titulación, manteniendo fija la concentración de ZnO NWs y variando la de enzima. Los espectros de absorción UV de los ZnO NWs en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de LOx se muestran en la figura 2.11. El máximo de absorción de los ZnO NWs a 373 nm sufre un efecto hipocrómico en presencia de la enzima, es decir, una disminución gradual de la absorbancia, que indica que existe algún tipo de interacción entre el nanomaterial y la LOx [Sasidharan, 2013].

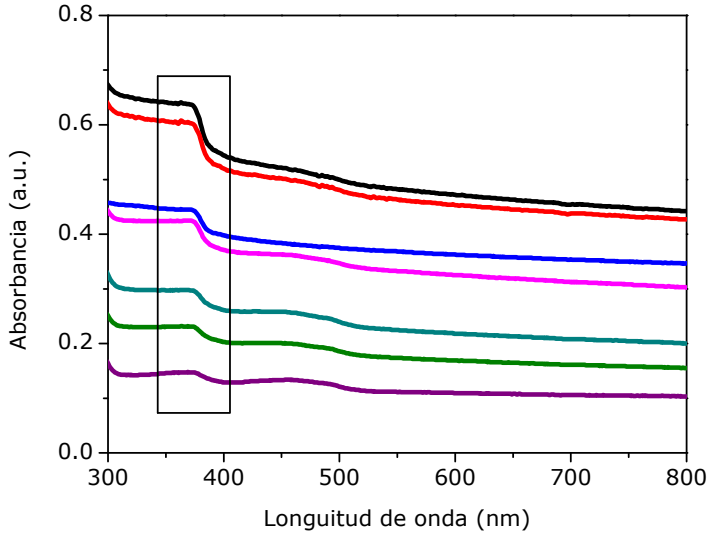


Fig. 2.11. Espectro de absorción UV-visible de una dispersión de los ZnO NWs 0.5 mg mL^{-1} en tampón fosfato pH 7.0 en ausencia (—) y en presencia de 2.5 (—), 3 (—), 3.5 (—), 4 (—), 4.5 (—) y 5 (—) mg mL^{-1} de LOx.

De los espectros de absorción obtenidos de los ZnO NWs con las distintas concentraciones de enzima se puede determinar la fortaleza de la interacción entre ambos, a partir de la constante intrínseca de enlace (K_b). Esta constante puede calcularse utilizando de la ecuación descrita por Becker y Meehan [Meehan, 1982]:

$$[\text{LOx}] / (\epsilon_{\text{ap}} - \epsilon_f) = [\text{LOx}] / (\epsilon_b - \epsilon_f) + 1 / K_b (\epsilon_{\text{ap}} - \epsilon_f) \quad (\text{Ec. 2.1})$$

- ϵ_{ap} es el coeficiente de extinción aparente, calculado dividiendo la absorbancia obtenida para cada concentración de LOx por la concentración de los ZnO NWs.
- ϵ_b es el coeficiente de extinción de los ZnO NWs unidos a la LOx. Se determina a partir de la pendiente de la recta que se obtiene al representar $[\text{LOx}] / (\epsilon_{\text{ap}} - \epsilon_f)$ frente a la concentración de LOx.

- ϵ_f es el coeficiente de extinción de los ZnO NWs sin enzima. Es una constante que se determina dividiendo la absorbancia de los ZnO NWs en ausencia de LOx por su concentración.

Del cociente entre la pendiente de la recta obtenida al representar $[LOx] / (\epsilon_{ap} - \epsilon_f)$ frente a $[LOx]$ y la ordenada en el origen se calculó el valor la constante K_b , siendo de $(1.02 \pm 0.05) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. Este valor indica una buena interacción entre el nanomaterial y la enzima.

Una vez demostrada la interacción entre los ZnO NWs y la LOx, la fortaleza de la misma se podría cuantificar mediante el cálculo de una constante similar a la de Stern-Volmer utilizando la ecuación 2.2, pero empleando, en este caso, la disminución de la absorbancia:

$$Abs_0 / Abs = 1 + K [LOx] \quad (\text{Ec 2.2})$$

Donde Abs_0 es la absorbancia del ZnO NWs en ausencia de LOx y Abs la absorbancia a las distintas concentraciones de enzima. En la figura 2.12 se presenta la absorbancia frente concentraciones crecientes de LOx para una concentración de ZnO NWs constante (30 mM). K se obtiene de la pendiente de la recta, siendo en este caso de $(6.7 \pm 0.8) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Este resultado es comparable con los reportados en la bibliografía para la interacción del ZnO con otras proteínas, como albúmina de suero bovino, que presenta un valor de $K_{SV} 2.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ [Kathiravan, 2009], y con moléculas, como la tioacetamida, con un valor de $K_{SV} 1.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ [Saha D, 2018].

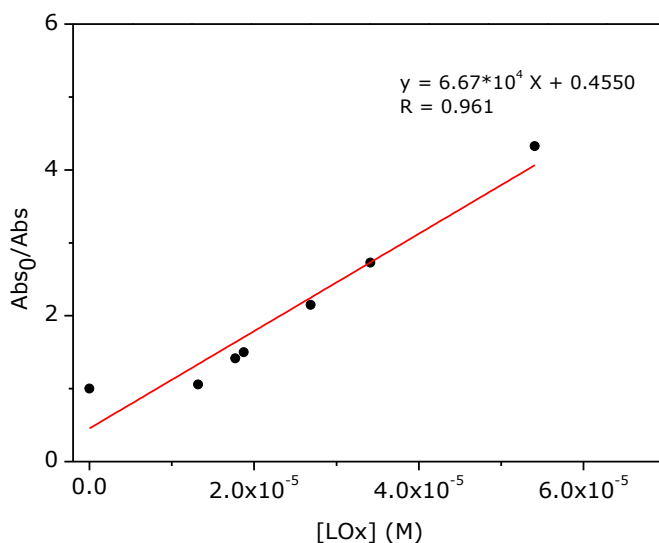


Fig. 2.12. Representación de la absorbancia (Abs_0/Abs) frente a la concentración de LOx.

2.3.2. Optimización del tiempo de interacción de los ZnO NWs con la enzima (LOx)

Una vez establecido que existe interacción, se llevó a cabo un estudio para la optimización del tiempo de reacción entre los ZnO NWs y LOx para la formación del bioconjugado (ZnO NWs-LOx). Para ello se preparó una dispersión de ZnO NWs en una concentración 0.5 mg mL⁻¹ y de LOx, en una concentración final de 0.5 mg mL⁻¹, en tampón fosfato pH 7.0. Se dejó incubar durante 10 minutos, 1, 2 y 24 horas. La formación del bioconjugado y la influencia del tiempo de reacción se comprobó mediante la variación del espectro de emisión (con excitación a 330 nm) tras la adición de lactato en concentración 1 mM. Los espectros obtenidos para los distintos tiempos de reacción se presentan en la figura 2.13. En todos los casos, el espectro de emisión del bioconjugado sufre una disminución de la intensidad PL y un desplazamiento del máximo a longitudes de onda más cortas tras la adición de lactato.

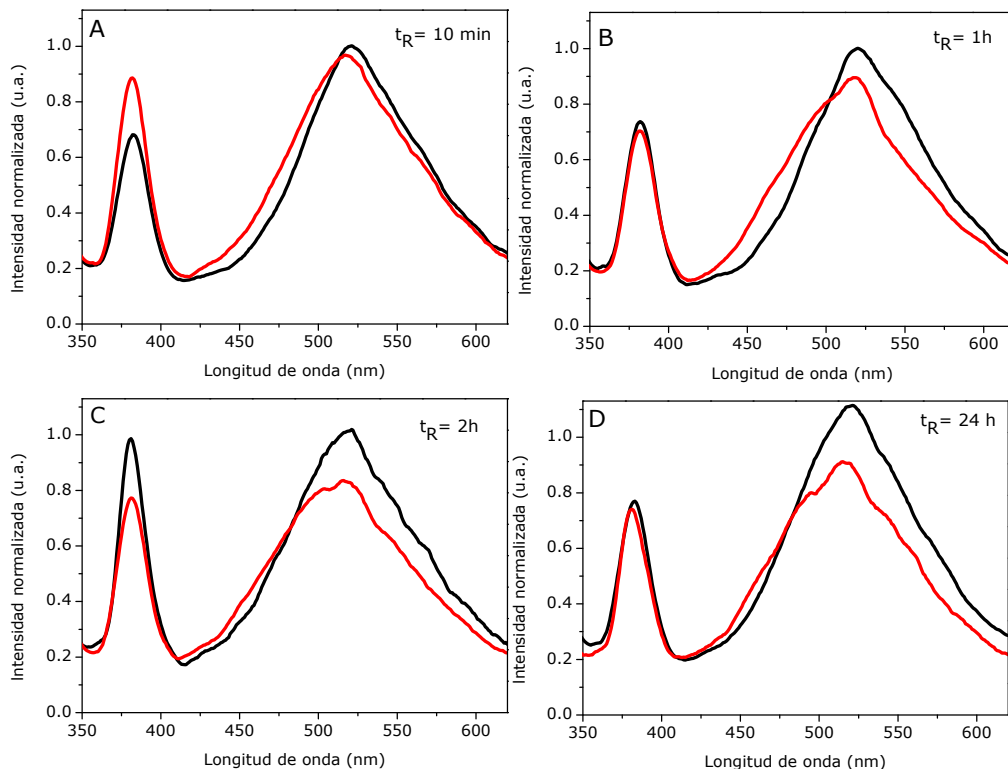


Fig. 2.13. Espectros PL de ZnO NWs-LOx (—) tras 10 minutos (A), 1 hora (B), 2 horas (C) y 24 horas (D) de incubación y adición de 1 mM de lactato (—).

La figura 2.14 muestra la variación de intensidad de fluorescencia frente al tiempo de reacción de los ZnO NWs con la LOx. Como se puede observar, la interacción progresa de forma rápida durante las primeras 2 horas, sin embargo, tras 24 horas de reacción no se observa apenas variación en la disminución de la intensidad de fluorescencia con respecto a la obtenida tras 2 horas. Por tanto, se tomó 2 horas como tiempo óptimo de reacción para la formación del bioconjugado.

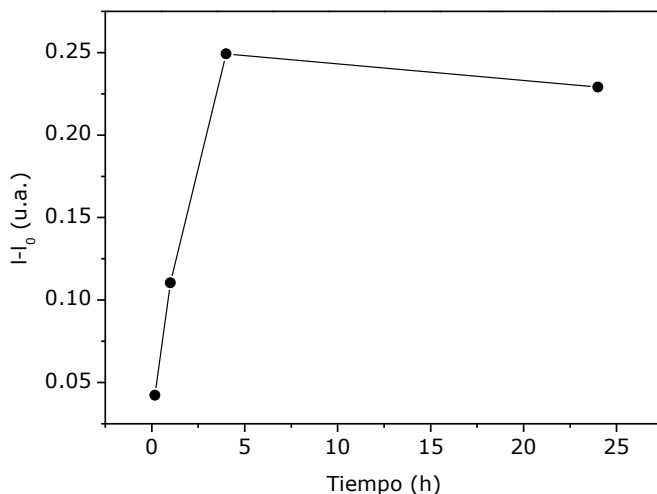
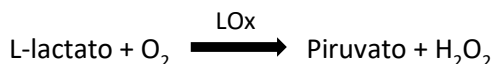


Fig. 2.14. Variación de la intensidad PL del bioconjugado ZnO NWs-LOx tras la adición de 1 mM de lactato frente al tiempo de reacción.

La oxidación enzimática del lactato, como ya se ha comentado, se lleva a cabo según la siguiente ecuación:



La LOx cataliza la oxidación del L-lactato a piruvato, generando peróxido de hidrógeno. De acuerdo con esta reacción, la cantidad de H_2O_2 generada es proporcional a la cantidad de moléculas de lactato presentes en la disolución.

La amortiguación de la intensidad PL por colisión se produce cuando el estado excitado de un fluoróforo se desactiva por contacto con otras moléculas en disolución, las denominadas amortiguadoras. De acuerdo con la bibliografía aceptores de electrones o huecos, adsorbidos en la superficie de quantum dots, pueden cambiar sus propiedades luminiscentes y producir la disminución de la intensidad de emisión mediante transferencia electrónica [Hasselbarth, 1993;

Landes, 2001]. Si el tamaño de las nanoestructuras de ZnO es suficientemente pequeño, las bandas de valencia y de conducción pueden separarse por efecto cuántico aumentando su salto de banda. Si esto se produce, es posible que la transferencia electrónica desde el estado excitado del ZnO al peróxido de hidrógeno sea energéticamente más favorable, al haber aumentado el salto de banda. De esta manera, la amortiguación por colisión se convierte en una vía de relajación del estado excitado del ZnO. Los electrones del ZnO excitados por la radiación UV pueden ser transferidos al peróxido de hidrógeno, que actúa como aceptor de electrones, causando así una disminución de la intensidad de fluorescencia. En la figura 2.15 se presenta el mecanismo propuesto de amortiguación [Kim K., 2012].

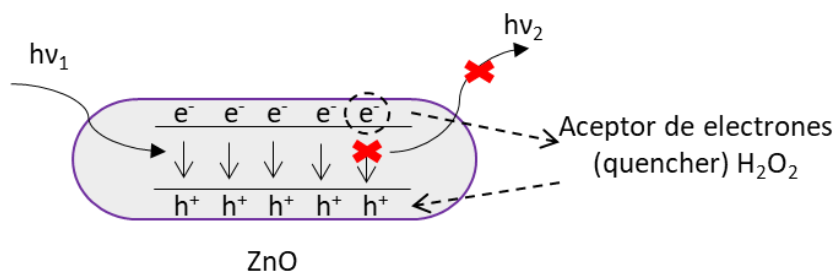


Fig. 2.15. Mecanismo de amortiguación.

2.3.3. Caracterización del bioconjugado mediante microscopía de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia es una técnica que combina la microscopía óptica convencional con la emisión fluorescente. Cuando la fluorescencia se acopla a un microscopio tradicional se le denomina “epifluorescencia”, porque se sitúa por encima del sistema óptico del microscopio, trabajando en reflexión. La microscopía de fluorescencia está siendo una herramienta fundamental en biología y biomedicina, así como en ciencia de materiales, debido a sus ventajas frente a la

microscopía óptica tradicional. Entre estas ventajas están, por ejemplo, la posibilidad de emplear varios fluoróforos para la identificación de células y componentes celulares a nivel submicroscópico con una elevada especificidad, determinar la presencia de una sola molécula en una muestra, etc. [Andersson-Engels, 1994; Suhling, 2002].

Se empleó esta técnica con el fin de comprobar la formación del bioconjugado ZnO NWs-enzima. Para ello, en primer lugar, a modo de control, se obtuvo la imagen correspondiente de una dispersión de los ZnO NWs en H₂O, excitando a 330 nm, que se presentan en la figura 2.16 A. También se obtuvo la imagen correspondiente de una disolución de la enzima LOx, excitando a la misma longitud de onda (figura 2.16.C). En la figura 2.16 A se pueden observar varios cúmulos de los ZnO NWs que emiten en el verde, lo que se corresponde con el espectro PL obtenido de los ZnO NWs (figura 2.6). En el caso de la enzima, sin embargo, no se observa fluorescencia al excitar a esta longitud de onda (figura 2.16 C). Posteriormente, se procedió a caracterizar el bioconjugado ZnO NWs-LOx formado tras 2 horas de reacción. Se obtuvo la imagen por microscopía de fluorescencia de una dispersión del bioconjugado ZnO NWs-LOx en H₂O, excitando a 330 nm. Al comparar las imágenes obtenidas de los ZnO NWs y del bioconjugado con la enzima, figuras 2.16 A y 2.16 B respectivamente, se observa que la emisión del bioconjugado ZnO NWs-LOx se mantiene en la misma zona del espectro UV visible que los ZnO NWs y aparecen mayor número de aglomerados. Esto parece indicar que la presencia de la enzima favorece la formación de dichos aglomerados.

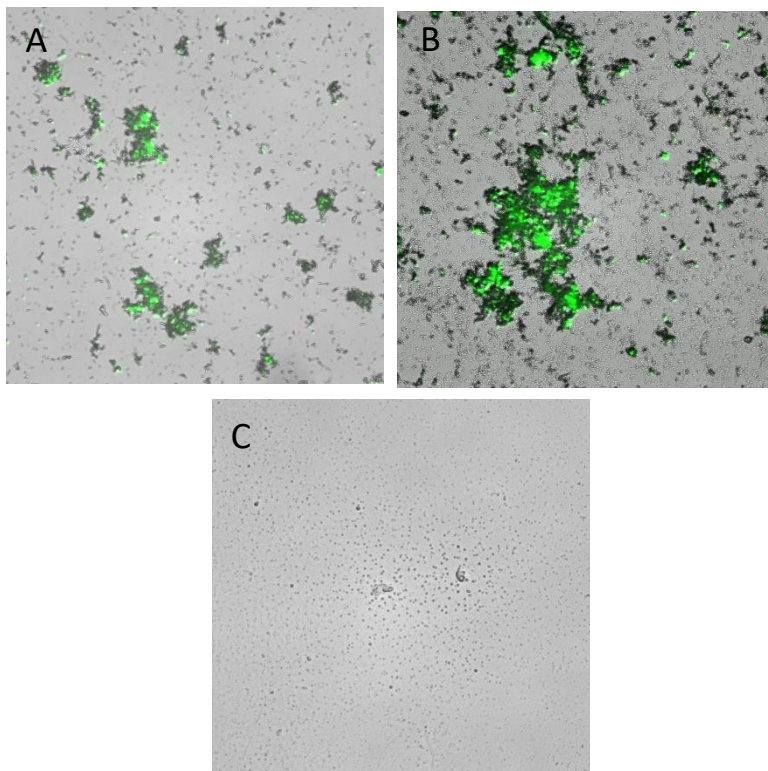


Fig. 2.16. Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de los ZnO NWs (A), del bioconjugado ZnO NWs-LOx (B), y de una disolución de LOx (C), en H_2O , excitando a 330 nm, aumento 10x.

2.4. Respuesta del bioconjugado ZnO NWs-LOx frente la adición de lactato

Una vez preparado el bioconjugado se estudió su comportamiento frente a la adición de lactato según el procedimiento descrito en el apartado 4.15 de materiales y métodos. Se monitorizó la variación en la intensidad PL del bioconjugado a 520 nm antes y después de la adición de concentraciones crecientes de lactato, utilizando una longitud de onda de excitación de 330 nm. En la figura 2.17 se muestran los valores medios obtenidos para tres determinaciones. Tras la adición de concentraciones crecientes de lactato se observa una disminución en la

intensidad PL del bioconjugado debido a la presencia del H_2O_2 generado en la reacción enzimática. Este H_2O_2 actúa como amortiguador de la fluorescencia del ZnO y es proporcional a la concentración de lactato añadido [Kim K., 2012]. La respuesta obtenida es lineal hasta 28 mM y se obtuvieron unos límites de detección y cuantificación de 6.4 y 21 mM, respectivamente.

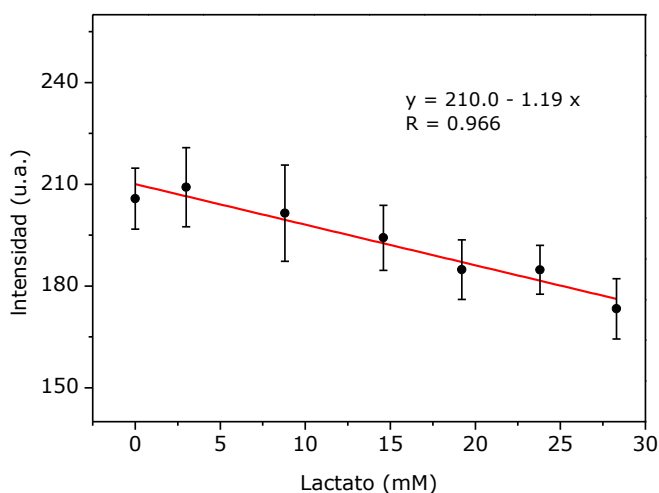


Fig. 2.17. Variación de la intensidad PL del bioconjugado ZnO NWs-LOx a 520 nm frente a la concentración de lactato.

De la misma manera, como control, se obtuvieron los espectros PL de una dispersión de ZnO NWs, sometida al mismo proceso de incubación y centrifugación que se llevó a cabo para la formación del bioconjugado, tras añadir concentraciones crecientes de lactato. En la figura 2.18 se muestran los valores medios obtenidos de tres determinaciones. En este caso, la adición de cantidades crecientes de lactato no causa ningún efecto sobre la PL del nanomaterial.

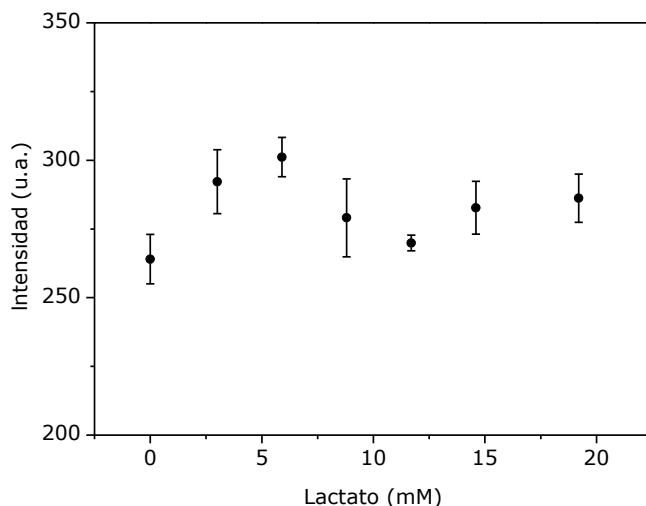


Fig. 2.18. Variación de la intensidad PL del ZnO NWs a 520 nm frente a la concentración de lactato.

Como se puede observar, en las figuras 2.17 y 2.18, la intensidad PL del bioconjugado antes de añadir lactato, es inferior a la intensidad inicial obtenida para los ZnO NWs sin conjugar con la enzima. Teniendo en cuenta que el pico a 520 nm proviene de defectos por vacantes de oxígeno, y, aunque aún no se conoce el mecanismo exacto, la LOx contiene grupos amida y carboxilo que podrían reaccionar con estas vacantes de oxígeno presentes en la superficie del ZnO, disminuyendo así la intensidad PL [Kim K., 2012].

Dado que las técnicas ópticas destacan por su sensibilidad, se estudió la respuesta del bioconjugado ZnO NWs-LOx frente a concentraciones de lactato más bajas. En la figura 2.19 se presentan los valores medios obtenidos de tres determinaciones.

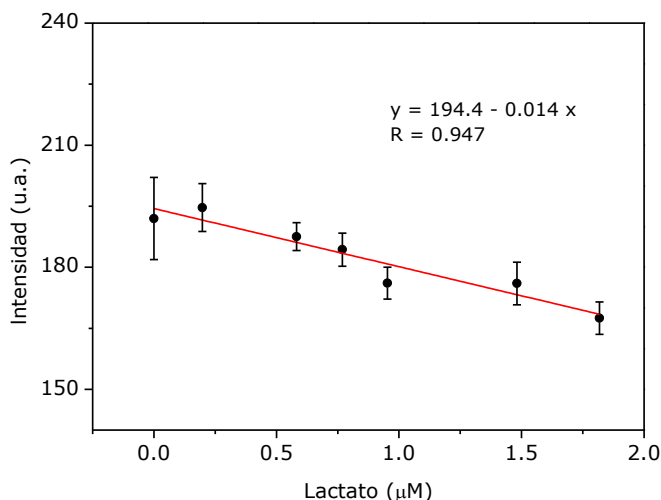


Fig. 2.19. Variación de la intensidad PL del bioconjugado ZnO NWs-LOx a 520 nm frente a la concentración de lactato.

Al aumentar la concentración de lactato en la disolución se produce una disminución de la intensidad PL del bioconjugado ZnO NWs-LOx. Esta disminución es lineal hasta 1.9 μM. De la recta de calibrado obtenida se calcularon los parámetros analíticos, obteniéndose un límite de detección de 0.54 μM y un límite de cuantificación de 1.8 μM. Si bien es cierto que la sensibilidad es baja, los límites de detección alcanzados permiten la determinación del analito en diversas muestras, como por ejemplo en muestras de sangre, donde se encuentra en unos valores normales de entre 0.50 y 1.5 mM [Stanley, 1985]. Además, estos resultados son comparables con los reportados en la bibliografía para otros métodos ópticos de determinación de lactato, con la ventaja de que en este caso no se requiere la adición de otros reactivos como luminol y aluminio metálico [Ballesta-Claver, 2008]. Este límite de detección es también comparable al alcanzado con un biosensor óptico que utiliza lactato deshidrogenasa como reactivo de reconocimiento [Liu X., 1999]. La reproducibilidad, al tratarse de una dispersión es más variable.

CAPÍTULO 3

MODIFICACIÓN DE NANOESTRUCTURAS MEDIANTE ELECTROQUÍMICA BIPOLAR COMBINADA CON RADIACIÓN UV (BPE&UV)

La electroquímica bipolar (BPE) es un fenómeno basado en la polarización de un material conductor en un campo eléctrico. Esta polarización genera una diferencia de potencial entre los dos extremos del material que es igual al campo eléctrico multiplicado por el tamaño del objeto. Si esta diferencia de potencial es suficiente se pueden dar reacciones redox en los extremos del objeto, la oxidación ocurrirá en un extremo mientras que, simultáneamente, se dará la reducción en el otro extremo. Por tanto, se genera una reactividad diferente en la superficie de objetos conductores (partículas Janus) de forma inalámbrica. Este comportamiento resulta muy interesante para muchos fines, como la preparación de nuevos materiales, sensado, etc.[*Fosdick, 2013*].

La diferencia de potencial necesaria para generar la polarización del material depende del tamaño de este. Por tanto, para tamaños del orden de nanómetros, la diferencia de potencial necesaria para poder generar esa polarización es muy elevada. Sin embargo, la aplicación de la electroquímica bipolar junto con la exposición simultánea a radiación ultravioleta (BPE&UV) permite superar esta limitación de la técnica [*Ongaro, 2014*]. La aplicación de la radiación UV provoca el salto de los electrones a la banda de conducción, generando un par electrón-hueco, mientras que la aplicación de la diferencia de potencial hace que este par electrón-hueco se desplace cada uno a un extremo del objeto, rompiendo así su simetría. Lo que genera la reacción de oxidación-reducción en este caso no es la diferencia de potencial aplicado, sino la radiación aplicada [*Tiewcharoen, 2017*].

En este sentido, en el trabajo de esta tesis doctoral se ha querido aplicar este fenómeno a diversos nanomateriales, en concreto a un tipo de nanopartículas de diamante de un tamaño entre 3 y 10 nm y dopadas con boro (DNPsB), y a nanohilos de ZnO (ZnO NWs), de entre 10 y 30 μm que han sido sintetizados por el grupo del Profesor José Luis Pau, del Departamento de Física Aplicada de la Universidad Autónoma de Madrid. Se trata de conseguir la modificación asimétrica, tanto de las

DNPsB como de los ZnO NWs, con un depósito de oro, con el objetivo de emplearlos como posibles plataformas para el biosensado.

3.1. Construcción de la celda empleada

La electroquímica bipolar se ha de llevar a cabo en una celda electroquímica de características especiales, como la mostrada en la figura 3.1.

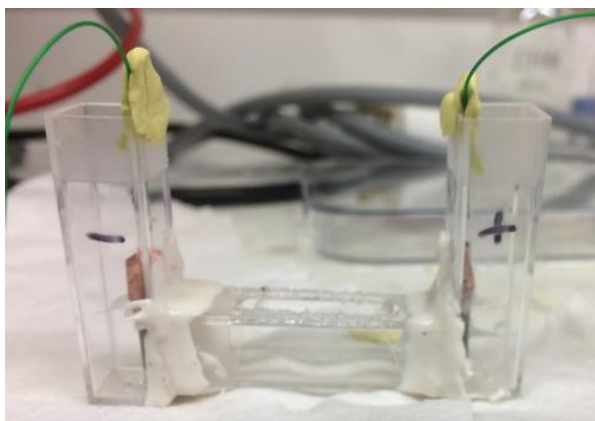


Fig. 3.1. Celda fabricada.

Esta celda consta de tres compartimentos, uno central, que llamaremos compartimento de reacción, y dos laterales, para los electrodos. El compartimento de reacción se fabricó con una abertura superior para permitir la aplicación de la radiación UV sobre la muestra. Para la fabricación de esta celda se emplearon cubetas de plástico, y minas de grafito ensambladas con cobre, para los electrodos. El compartimento de reacción está separado de los compartimentos de los electrodos mediante una lámina de Nafion.

Para comprobar que la celda funciona correctamente, en primer lugar, se utilizó con la técnica BPE clásica para la modificación asimétrica de unas partículas de

carbón de 1 mm de diámetro con un depósito de oro. Para ello se inmovilizaron varias partículas sobre cinta adhesiva en el compartimento de reacción y se cubrieron con 2 mL de una disolución de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 2 mM en $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ (95:5%V) [Tiewcharoen, 2017] como se indica en la figura 3.2.

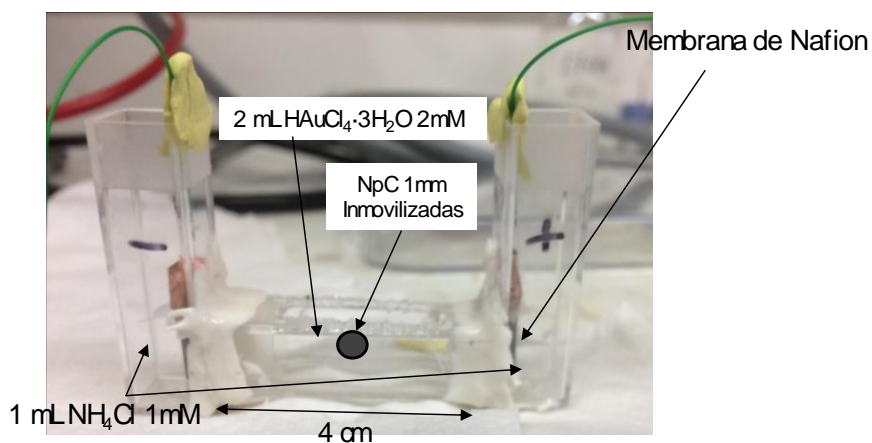
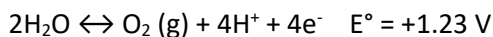
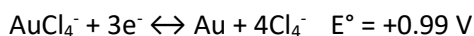


Fig. 3.2. Configuración del experimento BPE realizado para la modificación las partículas de carbono de 1mm de diámetro.

La reacción que tiene lugar es la reducción de la sal de oro a oro metálico y la oxidación de las moléculas de agua según las siguientes ecuaciones:



$$\Delta E = 1.23 - 0.99 = 0.24 \text{ V}$$

Teniendo en cuenta la diferencia de potencial necesaria para producir la reacción de oxidación-reducción, la distancia entre los electrodos y el tamaño de la nanopartícula podemos calcular la diferencia de potencial necesaria para producir la deposición asimétrica de oro sobre la partícula empleando la siguiente ecuación:

$$E_{\text{tot}} = \frac{\Delta E_{\text{elect}} \times l_{\text{channel}}}{l_{\text{elect}}} \quad (\text{Ec. 3.1})$$

$$E_{\text{tot}} = \frac{0.24 \text{ V} \times 4 \text{ cm}}{0.1 \text{ cm}} = 80 \text{ V}$$

El resultado obtenido es de 80 V, por tanto, es necesario aplicar una diferencial de potencial de al menos 80 V para que se produzca la reacción de óxido-reducción. Por tanto, se aplicaron 100 V durante 15 minutos, con el fin de asegurar que la reacción de oxidación-reducción se produce.

Como se puede observar en la figura 3.3 A, el depósito asimétrico de oro producido tras la aplicación de la BPE sobre las partículas de carbono se puede ver a simple vista. Para ver con más detalle el depósito se utilizó la microscopía electrónica de barrido (SEM). En la figura 3.3 B se presenta la imagen de SEM de una de las partículas de carbono modificadas. En ella se puede observar con claridad el depósito asimétrico de oro sobre la partícula de carbono. Con este resultado se confirma que la celda es adecuada para su empleo en experimentos de electroquímica bipolar.

En este caso se obtuvo un depósito hemiesférico, pero, dependiendo de las condiciones experimentales empleadas, mediante esta técnica se pueden obtener depósitos metálicos concentrados en un solo punto de la superficie de la partícula. El tamaño del depósito metálico depende del campo eléctrico aplicado, de la concentración de la sal empleada, así como de la cinética de la reacción redox [Loget, 2012].

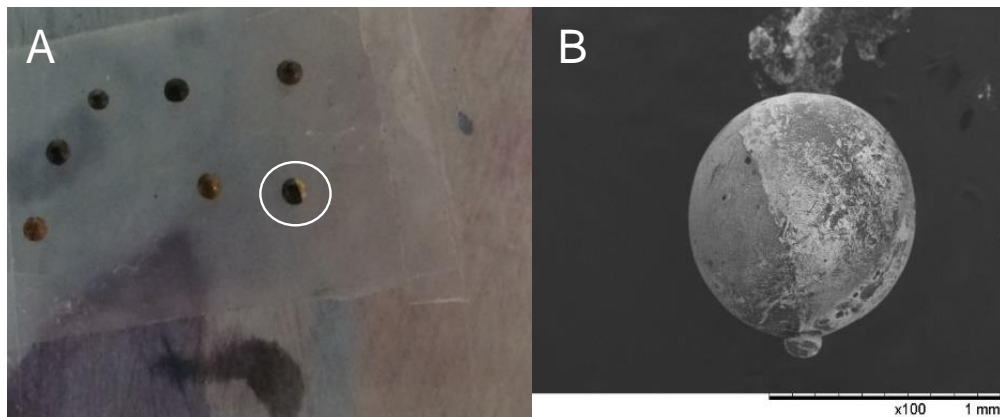


Fig. 3.3. Fotografía a escala real de las partículas sometidas a BPE (A). Imagen de SEM obtenida de una de las partículas de carbono modificadas mediante BPE (B).

3.2. Aplicación de BPE&UV sobre DNPsB

Además de su pequeño tamaño, de entre 3 y 10 nm, según el fabricante, la aplicación de la BPE sobre las nanopartículas de diamante presenta otra limitación, esta es, la baja conductividad superficial. Se sabe que el dopaje de nanopartículas de diamante con átomos de boro (DNPsB) aporta conductividad a la nanopartícula, en concreto conductividad tipo-p [Nunn, 2017], por tanto, este tipo de nanopartículas fueron las que se emplearon para su modificación asimétrica mediante BPE&UV.

3.2.1. Caracterización morfológica de las DNPsB mediante AFM

En primer lugar, se observó la morfología de las DNPsB mediante AFM. Para ello se modificó una placa de mica con una suspensión de DNPsB $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ en EtOH, mediante inmersión. En la figura 3.4 se presenta la imagen de AFM obtenida para

las DNPsB (A) y el perfil de alturas (B) correspondiente a la línea blanca punteada de la imagen.

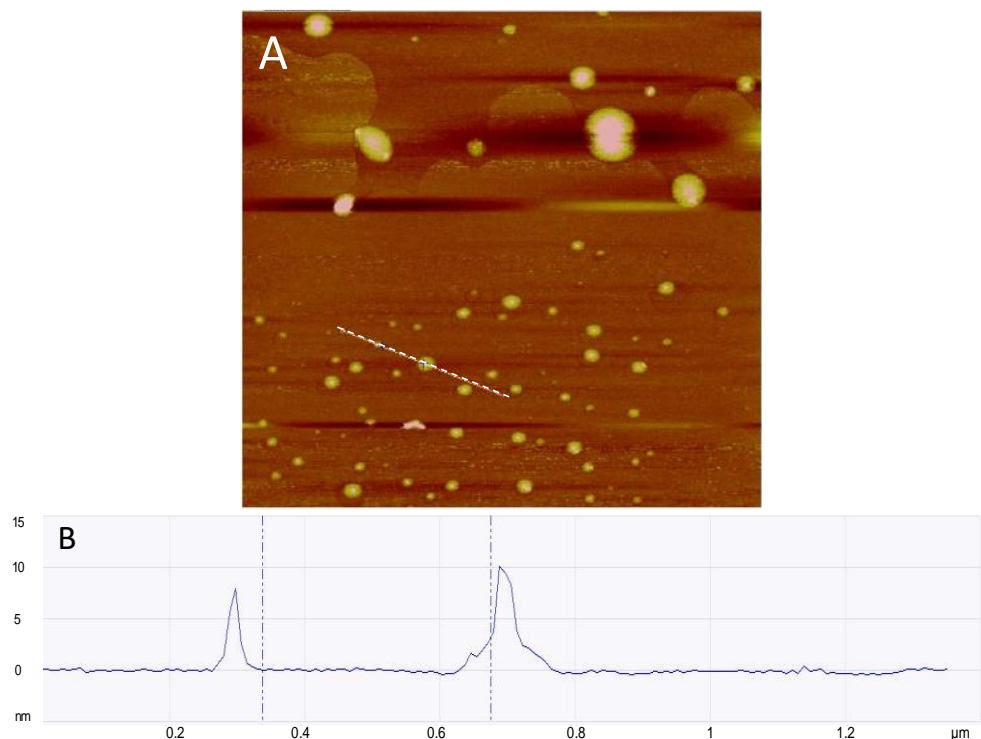


Fig. 3.4. Imagen AFM de una placa de mica modificada con DNPsB en EtOH (A). Perfil de alturas correspondiente a la línea punteada (B).

Como se puede observar, aparecen distintas estructuras nanogranulares sobre la superficie. Aparece un grupo, más numeroso, en la parte inferior de la imagen, y otro grupo formado por estructuras de mayor tamaño en la parte superior. Se tomó el perfil de alturas para las estructuras de menor tamaño, las más numerosas, siguiendo la línea punteada. En el perfil obtenido, figura 3.4 B, se puede ver los tamaños correspondientes a esas estructuras, siendo de entre 7 y 10 nm, lo que es consistente con el tamaño aportado por el fabricante de las DNPsB. Por tanto, teniendo en cuenta la tendencia a la agregación de las nanopartículas de diamante

[Shenderova, 2006], las estructuras de mayor tamaño corresponderían a cúmulos formados por varias nanopartículas.

3.2.2. Caracterización morfológica de las DNPsB mediante AFM tras la aplicación de BPE&UV

Se preparó una dispersión de DNPsB en la sal de oro (DNPsB/HAuCl₄), siguiendo el proceso descrito en el apartado 4.13 de materiales y métodos, obteniendo una concentración final de nanopartículas de 2.5 µg mL⁻¹. Se obtuvieron las imágenes de AFM de la dispersión DNPsB/HAuCl₄ antes y después de realizar el experimento de BPE&UV. Para ello se preparó una muestra mediante inmersión de una placa de mica, previamente exfoliada y lavada con agua y EtOH. Antes de realizar el experimento de BPE&UV, como se puede observar en la figura 3.5, aparecen estructuras redondeadas correspondientes a las DNPsB, y también se observan grandes cúmulos, nanopartículas agregadas. Las figuras 3.5 B y 3.5 C son imágenes obtenidas, con mayor aumento, de las nanoestructuras señaladas en la figura 3.5 A. Al obtener el perfil de dichas estructuras, siguiendo la línea punteada en las figuras 3.5 B y 3.5 C, se puede ver como en realidad se trata de un cúmulo de nanopartículas. Se obtuvo una imagen a mayor aumento, que se presenta en la figura 3.6, donde se aprecia la morfología redondeada de las partículas que forman el agregado.

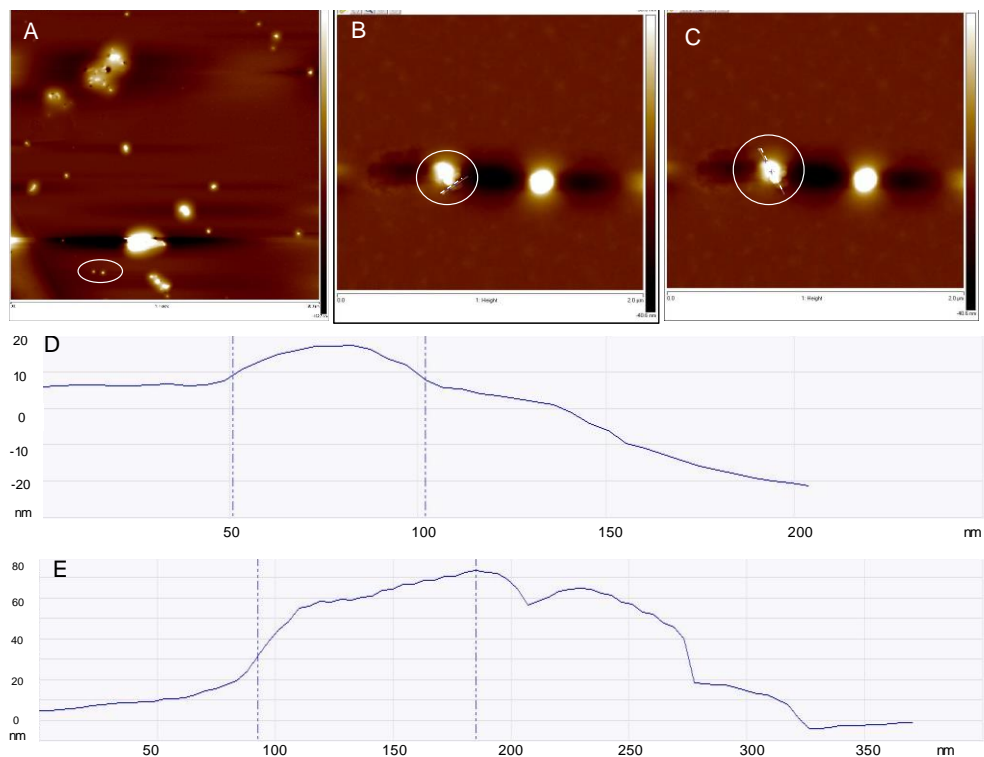


Fig. 3.5. Imagen AFM de la dispersión de las DNPBs en HAuCl₄ (A). Imágenes aumentadas de las DNPBs señaladas (B Y C) Perfil de alturas correspondiente a la línea punteada de B (D) y C (E).

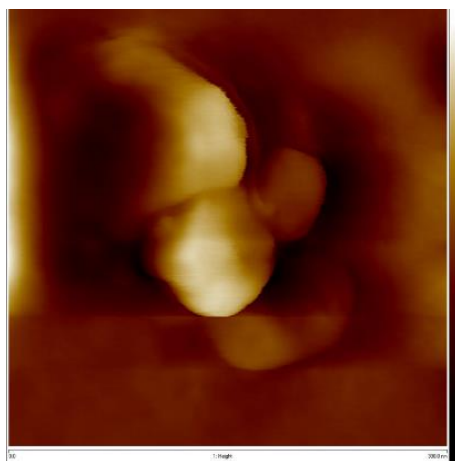


Fig. 3.6. Imagen AFM ampliada de las DNPBs/HAuCl₄.

A continuación, se llevó a cabo el experimento de BPE&UV introduciendo 2 mL de la dispersión de DNPsB/ HAuCl_4 en el compartimento de reacción de la celda y 1 mL de una disolución de NH_4Cl 1 mM en cada uno de los compartimentos para los electrodos. El experimento se llevó a cabo empleando el 50% de la potencia de la lámpara UV, aplicando 0.5 KV y a distintos tiempos de exposición. Finalmente, se obtuvieron las imágenes de AFM. En la figura 3.7 se muestra la imagen obtenida tras 10 segundos de exposición. En la figura se puede observar una estructura de unos 20-30 nm de perfil (figura 3.7 C y 3.7 D) que se correspondería con un agregado de nanopartículas de DNPsB. Sin embargo, en este caso no se observa una morfología redondeada como la observada antes de la aplicación de la BPE&UV, sino que se aprecia un contorno rugoso en toda la superficie de la nanoestructura. Este depósito rugoso podría corresponder a un depósito de oro metálico sobre la nanoestructura.

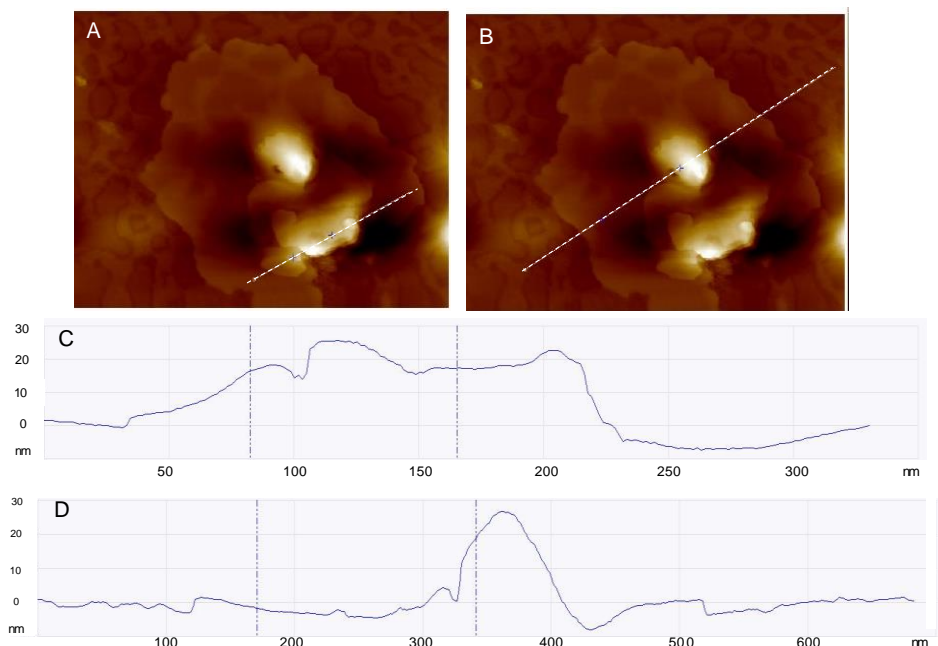


Fig. 3.7. Imagen AFM de la dispersión DNPBs/HAuCl₄ tras la aplicación de BPE&UV al 50% aplicando 0.5 KV durante 10 segundos (A y B). Perfil de alturas correspondiente a la línea punteada de A (C) y B (D).

Con el fin de intentar eliminar el exceso de depósito metálico sobre las nanopartículas, se cambió la estrategia en la preparación de la placa de mica para el estudio morfológico. Se sometió a la suspensión de DNPBs/HAuCl₄ a las mismas condiciones experimentales, pero, en este caso, una vez realizado el experimento, la suspensión se extendió sobre la placa de mica y se lavó cuidadosamente con agua antes de que se secase por completo, para intentar, de esta forma, eliminar el exceso de metal depositado sobre las nanopartículas. La figura 3.8 muestra el resultado obtenido siguiendo este procedimiento. Como se puede observar, la imagen de AFM obtenida de la placa de mica modificada por este método no presenta ningún indicio del rugosado observado previamente, por lo que no se puede afirmar si se ha producido o no depósito metálico sobre las nanopartículas.

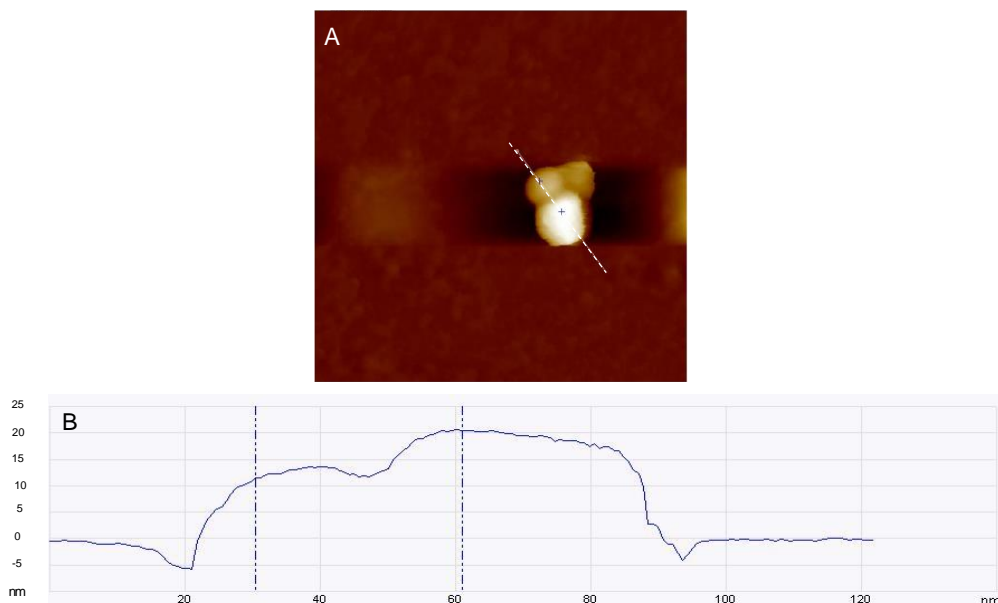


Fig. 3.8. Imagen AFM de DNPBs/HAuCl₄ obtenida tras la aplicación de BPE&UV 50%, 0.5 KV durante 10 segundos, modificando la placa de mica con la suspensión (A). Perfil de alturas correspondiente a la línea punteada (B).

3.2.3. Caracterización morfológica de las DNPBs mediante SEM tras la aplicación de BPE&UV

Ya que la microscopía AFM no proporciona resultados concluyentes sobre la modificación asimétrica de las DNPBs con oro, se utilizó también la microscopía electrónica de barrido (SEM) para la caracterización morfológica de las nanopartículas sometidas a BPE&UV.

En primer lugar, a modo de control, se estudió la reacción producida sobre una disolución de HAuCl₄ cuando se aplica la radiación UV durante distintos tiempos. Las muestras de la disolución se observaron por SEM antes y después de la radiación a los distintos tiempos. Para ello se depositaron sobre placas de mica por inmersión en la disolución.

En la figura 3.9 se presentan las imágenes de SEM obtenidas de la disolución de HAuCl_4 antes y tras la exposición a la luz UV durante 60, 300 y 1000 segundos. Como se puede observar en la figura 3.9 A, antes de haber irradiado la disolución de HAuCl_4 con luz UV, aparecen pequeños puntos brillantes que indican que, de manera espontánea, la sal de oro se reduce a oro metálico, es decir, no es totalmente estable. Al exponer a la misma disolución a tiempos crecientes de radiación UV (figura 3.9 B y C) se produce un aumento en la cantidad de oro metálico presente en la disolución. En la figura 3.9 D, correspondiente al mayor tiempo de exposición, se puede observar como se acaban formando cúmulos de mayor tamaño, compuestos por agregados de partículas de oro que se agrupan formando ovillos y ramificaciones. Se comprueba así, que la reacción de óxido-reducción de la sal de oro para formar oro metálico no se da por la aplicación de la diferencial de potencial, sino por la radiación UV.

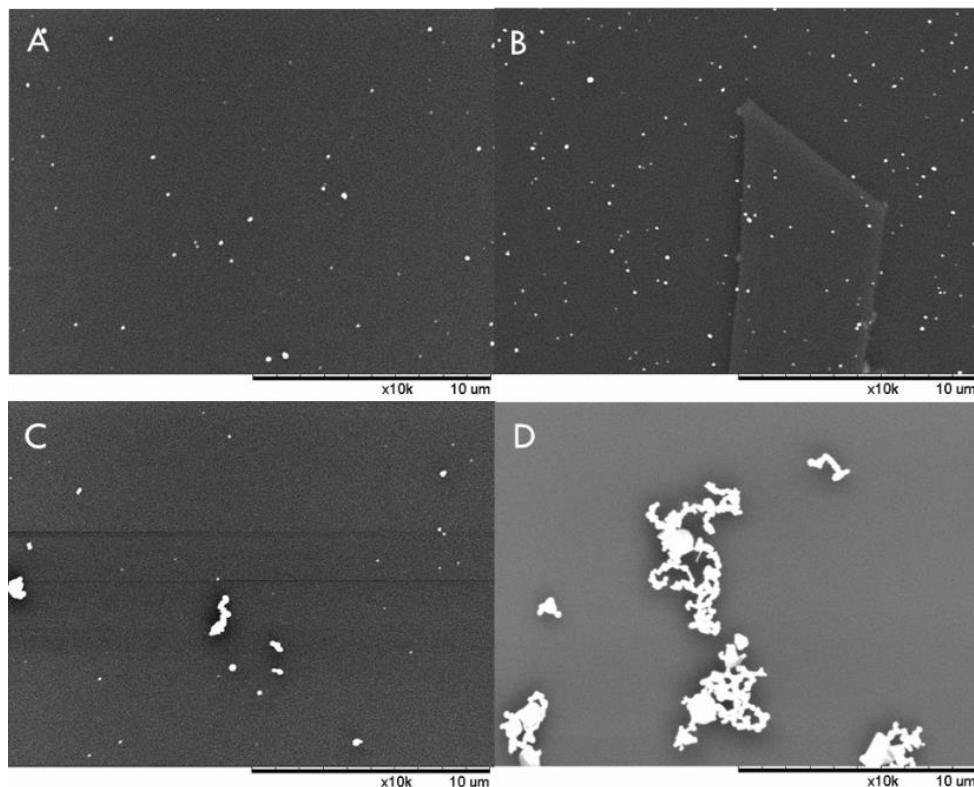


Fig. 3.9. Imagen SEM de la disolución de HAuCl_4 2 mM en $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ (95:5% V) antes (A) y tras radiar con UV 50% durante 60 s (B), 300 s (C) y 1000 s (D).

A continuación, se realizó el experimento de BPE&UV en la disolución de HAuCl_4 conteniendo las nanopartículas de diamante dopadas con boro (DNPsB/ HAuCl_4) preparada siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.13 de materiales y métodos. Se obtuvieron las imágenes de SEM correspondientes. Como control también se obtuvieron las imágenes antes de la aplicación de la BPE&UV. Antes de la realización del experimento, la imagen de SEM obtenida (figura 3.10 A) es muy similar a la que presenta la disolución de HAuCl_4 sin nanopartículas de diamante, lo que indica que las DNPsB, aunque dopadas con boro, no presentan una conductividad suficiente para poder ser observadas mediante SEM. Por tanto, para poder determinar si se produce depósito sobre las DNPsB, se estudió si la presencia

de las DNPsB en la disolución de HAuCl_4 cambia, de algún modo, el patrón en las estructuras que forma la sal de oro al reducirse a oro metálico, es decir, si forma otro tipo de estructuras diferentes a los cúmulos (figura 3.9 C) o a las ramificaciones (figura 3.9 D) debido a la presencia de las DNPsB. En la imagen de SEM obtenida de la dispersión DNPsB/ HAuCl_4 tras realizar el experimento de BPE&UV al 50% de potencia aplicando 0.5 KV durante 600 s (figura 3.10 B), se pueden ver cúmulos con recubrimiento metálico aparentemente uniforme. Sin embargo, ampliando la imagen (inserto figura 3.10 B) se observan zonas del cúmulo menos brillantes, que se podrían corresponder con DNPsB no modificadas con oro.

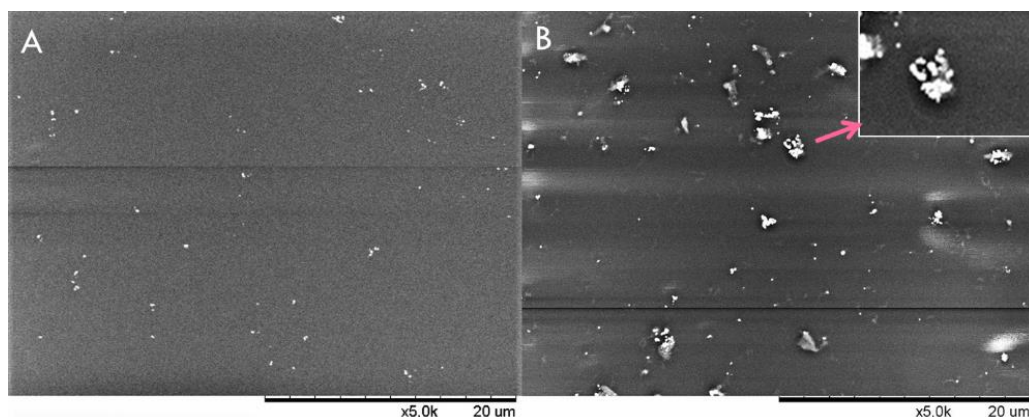


Fig. 3.10. Imágenes de SEM obtenidas de DNPsB/ HAuCl_4 antes (A) y después de aplicar BPE&UV 50% 0.5 KV durante 600 s (B).

Los experimentos descritos en el apartado anterior se llevaron a cabo en disolución. Sin embargo, la modificación de las DNPsB de forma asimétrica es más eficaz si se restringe su movilidad durante el experimento, ya que, de lo contrario, las estructuras pueden rotar libremente en la disolución y el depósito se puede producir en cualquier zona de la nanopartícula. Por ello se repitió el experimento, inmovilizando las nanopartículas en un gel de agarosa [Tiewcharoen, 2017]. Para ello, se preparó un gel de agarosa que contiene la sal de oro, HAuCl_4 2mM, y DNPsB

2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 1.6 de materiales y métodos. Una vez preparado, se introdujeron 2 mL del gel en el compartimento de reacción y se esperó a que solidificara. Los compartimentos de los electrodos, como hasta ahora, contienen 1 mL de NH_4Cl . Se estudió la morfología de las nanopartículas antes y después del experimento de BPE&UV, para ello se tomaron muestras antes y después del experimento mediante inmersión de una placa de mica, exfoliada y lavada, en el gel. Posteriormente, se lavó cuidadosamente con agua. Las imágenes A y B de la figura 3.11 corresponden a la muestra de DNPsB/ HAuCl_4 en gel antes de la realización del experimento de BPE&UV a distintos aumentos. Como se puede observar, aparecen los puntos brillantes correspondientes al oro reducido de forma espontánea. También se observan algunas zonas algo más borrosas correspondientes a restos que han podido quedar del gel sobre la mica. Tras la aplicación de BPE&UV 50%, 0.5 KV durante 600 s se obtuvieron las imágenes C y D que se presentan en la figura 3.11. En ellas se pueden observar unas estructuras que parecen agregados de nanopartículas. Se aprecian algunas zonas más brillantes que corresponderían a depósitos metálicos. Sin embargo, no se puede confirmar que exista una modificación asimétrica de las DNPsB.

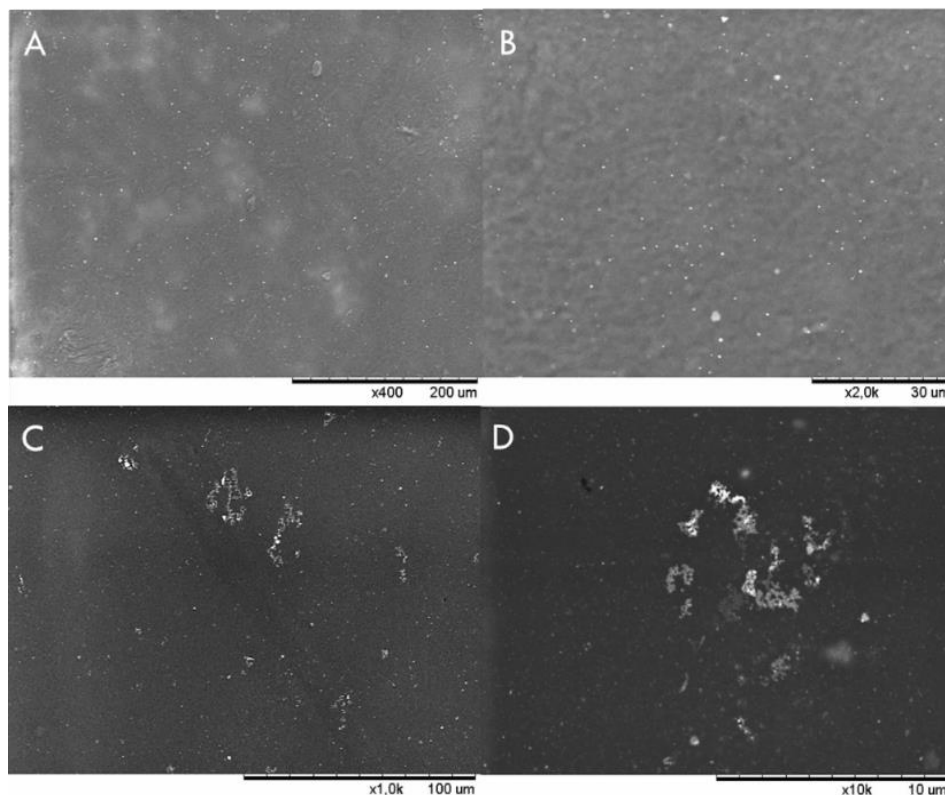


Fig. 3.11. Imagen SEM de DNPB/HAuCl₄ en gel de agarosa antes del experimento de BPE&UV tomada a 400x (A) y a 2000x (B) y tras la aplicación de BPE&UV 50%, 0.5 KV durante 600 s a 1000x (C) y 10000x (D).

3.3. Aplicación de BPE&UV para la modificación de ZnO NWs

Se aplicó la técnica BPE&UV también para la modificación asimétrica de los nanohilos de ZnO.

3.3.1. Caracterización morfológica del proceso de modificación mediante SEM

Al igual que en el caso de las DNPB, se utilizó la microscopía SEM para comprobar si la modificación del nanomaterial había tenido lugar.

A modo de control, antes de proceder a la modificación asimétrica de los ZnO NWs mediante BPE&UV, se estudió el efecto de la radiación UV sobre los nanohilos a distintos tiempos. En la figura 3.12 se presentan las imágenes de SEM obtenidas para ZnO NWs antes (figura 3.12 A) y tras haberlos irradiado con luz UV durante 60, 300 y 1000 segundos (Figura 3.12 B, C y D, respectivamente). De las imágenes obtenidas, se puede concluir que no se observa un efecto destacable sobre los nanohilos tras su exposición a radiación UV, a ninguno de los tiempos empleados.

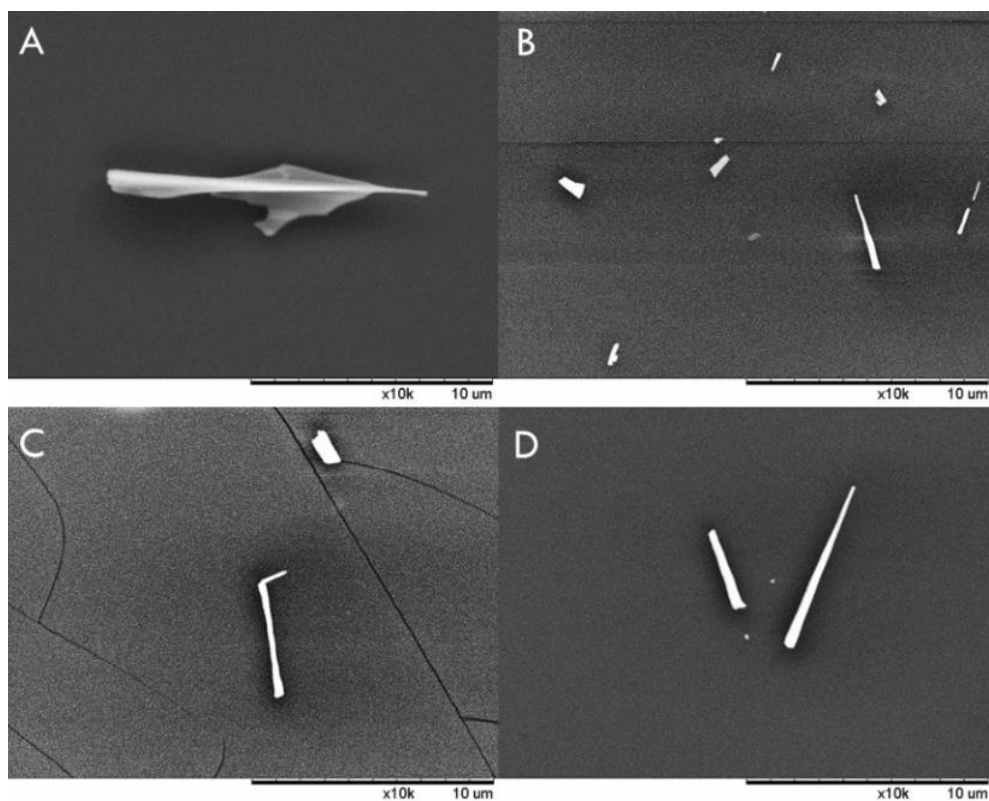


Fig. 3.12. Imagen SEM de ZnO NWs antes (A) y tras estar expuestos a radiación UV 50% durante 60 s (B) 300 s (C) y 1000 s (D).

Posteriormente, se preparó una dispersión de ZnO NWs 0.005% (p/v) en EtOH/H₂O siguiendo el protocolo descrito en el apartado 1.1 de materiales y métodos en

presencia de HAuCl_4 en concentración final 1 mM (ZnO NWs 0.005%/ HAuCl_4). Se aplicó radiación UV sobre la dispersión ZnO NWs 0.005%/ HAuCl_4 , empleando el 50% de potencia de la lámpara y durante distintos tiempos de exposición y se obtuvieron las imágenes SEM de las nanoestructuras resultantes, mediante inmersión de una placa de mica en el compartimento de reacción. En la figura 3.13 A se muestra la imagen correspondiente a la dispersión antes de la aplicación de la radiación UV, donde se puede observar que no existe deposición de oro sobre el nanohilo. Sin embargo, tras la aplicación de la radiación se aprecia claramente cómo se deposita el oro reducido sobre los nanohilos, en mayor cantidad a medida que aumenta el tiempo de exposición a la radiación (figura 3.13 B, C y D). Este comportamiento es el esperado ya que, como se comentó anteriormente, la aplicación de la luz UV sobre el semiconductor provoca el salto de los electrones de la banda de valencia a la banda de conducción generando pares electrón-hueco que dan lugar a la reacción de óxido-reducción sobre la superficie del nanohilo.

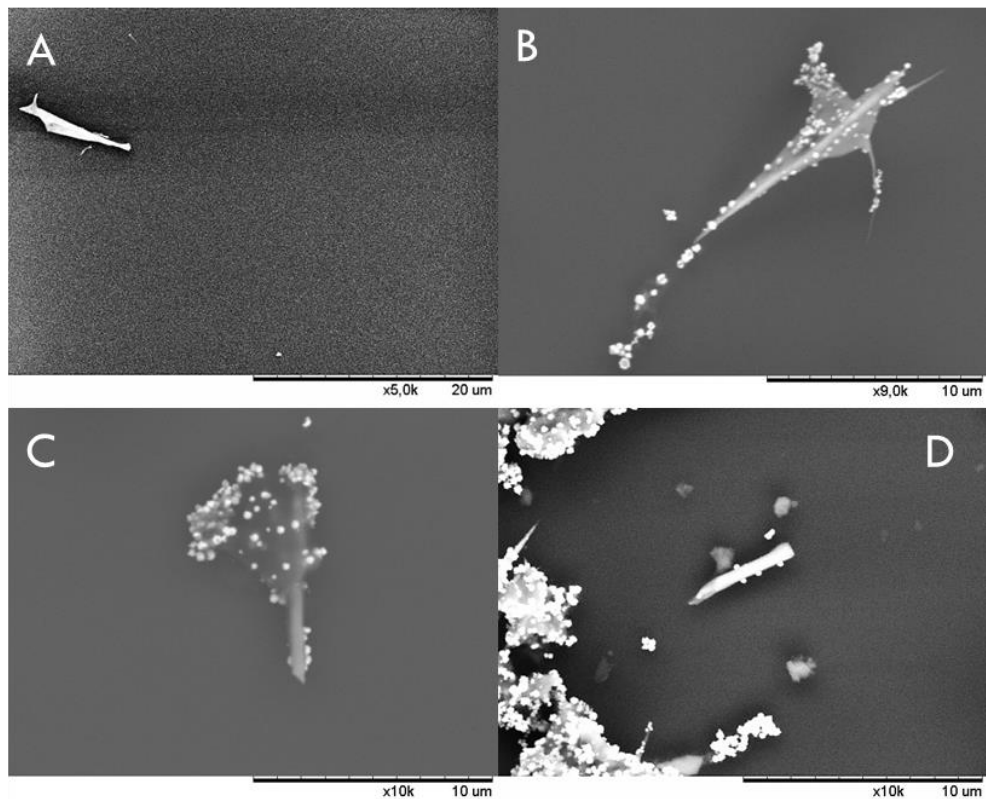


Fig. 3.13. Imagen SEM de ZnO NWs 0.005%/HAuCl₄ (A) y ZnO NWs 0.005%/HAuCl₄ expuestos a UV 50% durante 60 s (B) 300 s (C) y 1000 s (D).

El depósito de oro metálico generado por la radiación UV sobre los nanohilos se produce de forma más o menos homogénea por toda la superficie. De acuerdo con la bibliografía, la aplicación de un campo eléctrico suficientemente alto simultáneamente con la radiación, provoca la separación de las cargas facilitando así la deposición asimétrica sobre el semiconductor [Ongaro, 2014; Tiewcharoen, 2017]. Por tanto, con el fin de obtener nanoestructuras de ZnO modificadas de forma asimétrica, se aplicó la BPE&UV al 50% y 0.5 KV durante 300 s sobre una dispersión de ZnO NWs 0.050%/ HAuCl₄.

Como control, también se aplicó BPE clásica, sin radiación simultánea, sobre una dispersión de ZnO NWs 0.050%/ HAuCl₄, en las mismas condiciones.

A diferencia de las DNPsB, en el caso del ZnO NWs para poder obtener la modificación asimétrica no es necesario el empleo de ningún método que mantenga fijos los hilos, ya que, la polarización que se produce al aplicar la diferencia de potencial a la dispersión, hace que los nanohilos se orienten paralelos al campo eléctrico creado [Ongaro, 2014]. En la figura 3.14 se pueden observar las imágenes de SEM de la dispersión antes (figura 3.14 A) y después de la aplicación de BPE y BPE&UV (figuras 3.14 C y D, respectivamente). Como se puede observar, tras la aplicación de la BPE no existe depósito de oro sobre el ZnO NWs. Esto es lo esperado, ya que el campo eléctrico aplicado en este caso es inferior al que sería necesario para provocar la reacción redox en nanohilos de este tamaño. Sin embargo, tras la aplicación de BPE&UV si se aprecia el depósito ya que es la radiación UV la que da lugar a la reacción redox.

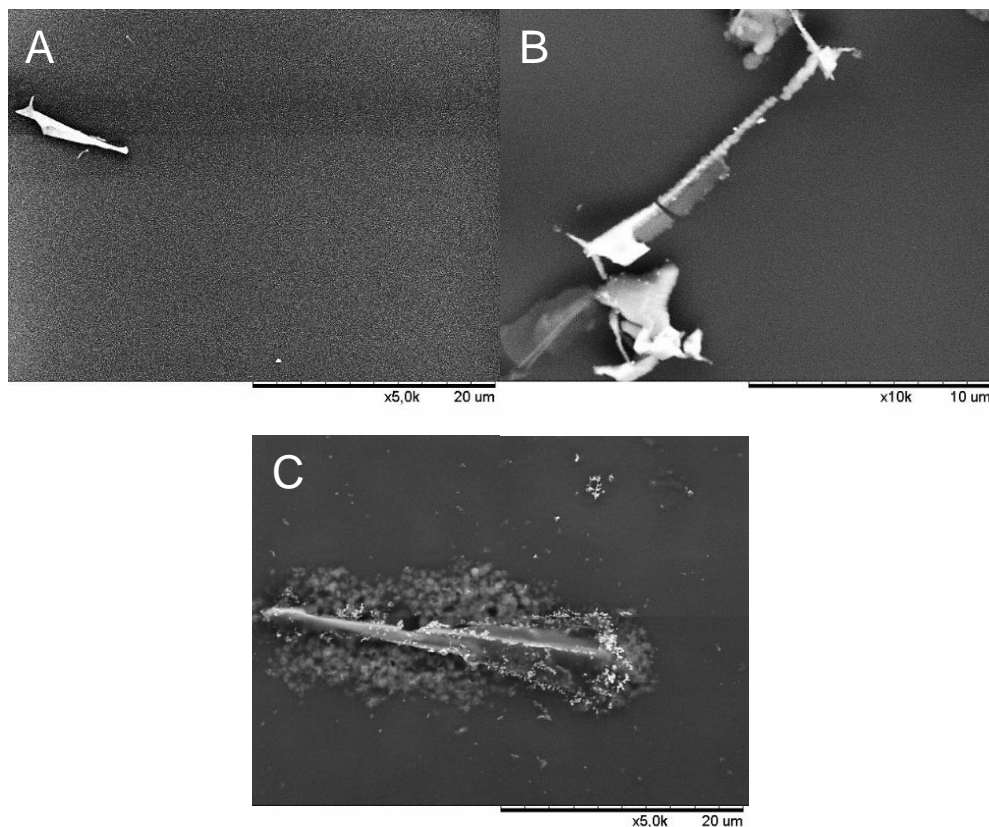


Fig. 3.14. Imagen SEM de ZnO NWs 0.005%/HAuCl₄ (A), ZnO NWs 0.005%/HAuCl₄ tras aplicar BPE de 0.5 KV durante 300 s (B) y ZnO NWs 0.005%/HAuCl₄ tras aplicar BPE&UV 50% 0.5 KV durante 300 s (C).

En la figura 3.15 se comparan las imágenes obtenidas tras la aplicación de radiación UV y la obtenida tras aplicar BPE&UV sobre la dispersión ZnO NWs 0.050%/ HAuCl₄, durante el mismo periodo de tiempo (Figura 3.15 A y B, respectivamente). Se puede observar cómo, en ambos casos, hay depósito metálico, pero no se puede concluir que la BPE&UV, empleando estas condiciones, de lugar a un depósito asimétrico.

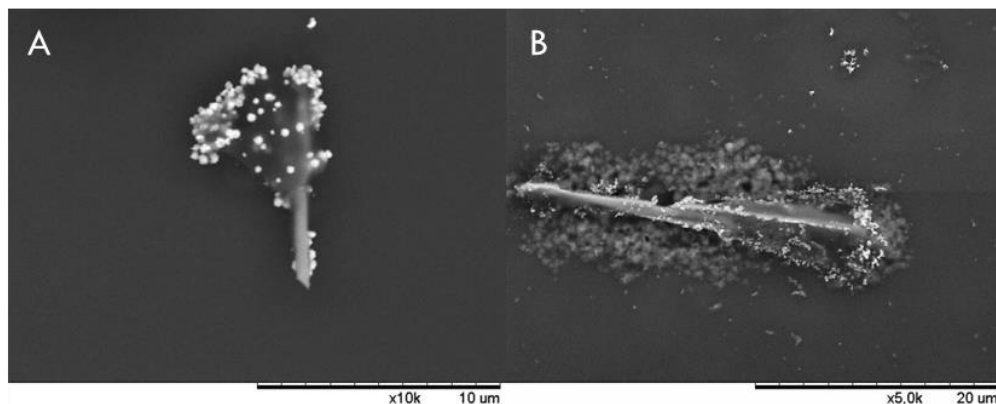


Fig. 3.15. Imagen SEM de ZnO NWs 0.005%/HAuCl₄ UV tras radiar con UV durante 300 s (A) y ZnO NWs 0.005%/HAuCl₄ tras aplicar BPE&UV 50%, 0.5 KV durante 300 s (B).

Con el fin de obtener un depósito de oro más localizado en uno de los extremos del ZnO NW se llevó a cabo el mismo experimento, pero reduciendo el tiempo de aplicación de BPE&UV de 300 s a 180 s. Como se puede observar en la figura 3.16, en estas condiciones si se aprecia un mayor depósito asimétrico sobre el nanohilo.

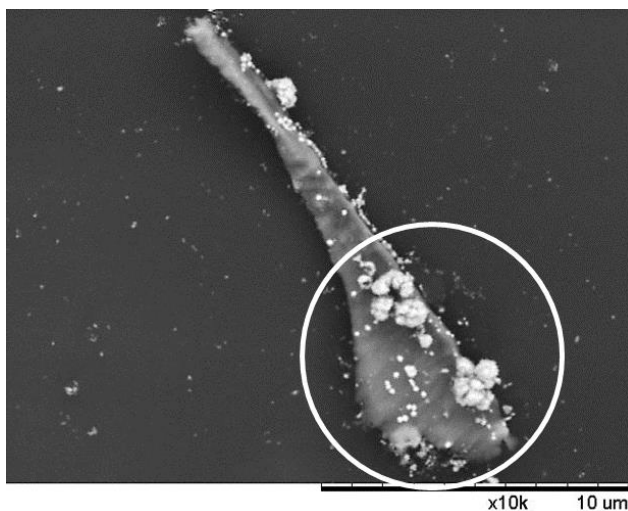


Fig. 3.16. Imagen SEM de ZnO NWs 0.005%/HAuCl₄ tras la aplicación de BPE&UV al 50%, 0.5 KV durante 180 s.

Se realizaron varios experimentos disminuyendo los tiempos de aplicación de BPE&UV, con el fin de obtener una mayor asimetría en el depósito metálico sobre el nanohilo, sin obtener buenos resultados.

Debido a la heterogeneidad de la muestra de partida, donde además de los nanohilos aislados aparecen algunos cúmulos y estructuras tipo tetrapodo, la presencia de nanohilos aislados en las muestras tomadas tras los experimentos no es muy abundante. Por tanto, también se llevaron a cabo los experimentos de BPE&UV empleando dispersiones de ZnO NWs/HAuCl₄ con una mayor concentración de ZnO, con el fin de aumentar las posibilidades de obtener nanohilos aislados modificados asimétricamente. Para ello se emplearon dispersiones de ZnO NWs al 0.01% y al 0.05% preparadas de la misma manera que la empleada hasta ahora. Sin embargo, no se lograron resultados satisfactorios.

Otra de las estrategias empleadas para maximizar el número de nanohilos aislados presentes en la muestra de partida consistió en someter a la dispersión de ZnO NWs a un proceso de sonicación seguido de una centrifugación. Para ello, se realizó un estudio aplicando distintos tiempos de sonicación (15 y 30 minutos), con el fin de disgregar los posibles cúmulos formados por nanohilos y, posteriormente, se aplicaron distintos tiempos de centrifugación (15, 30 y 60 minutos), con el fin de separar los cúmulos de los nanohilos aislados. Las muestras de la dispersión resultante para su caracterización por SEM se tomaron modificando una placa de mica con el sobrenadante resultante de la centrifugación. Tampoco así se consiguió aumentar la presencia de nanohilos aislados en la muestra.

3.3.3. Aplicación de BPE&UV sobre nanohilos de ZnO inmovilizados sobre mica

Ya que no se consiguió mejorar la homogeneidad de la dispersión de nanohilos de partida mediante el proceso de sonicación y centrifugación, se cambió de estrategia utilizando otra metodología en la realización del experimento, con el objetivo de aumentar las posibilidades de observar nanohilos aislados y modificados. En este caso los experimentos se llevaron a cabo, en lugar de en disolución, sobre una placa de mica modificada con una dispersión de ZnO NWs de concentración 0.5 mg mL^{-1} en agua, previamente sonicada 10 minutos. La placa de mica modificada con ZnO NWs se inmovilizó en la base del compartimento de reacción, empleando cinta adhesiva, y posteriormente se cubrió con 2 mL de la disolución de HAuCl_4 2 mM, como indica la figura 3.17.

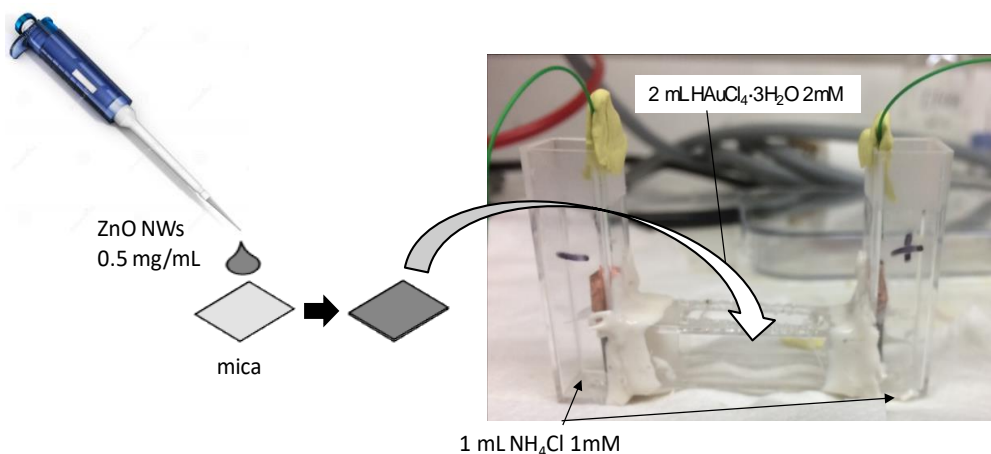


Fig. 3.17. Procedimiento de los experimentos de BPE&UV aplicados a una placa de mica previamente modificada con ZnO NWs.

En primer lugar, se obtuvieron varias imágenes SEM de la placa de mica modificada con los ZnO NWs antes de realizar el experimento (figura 3.18). Como se puede ver en las imágenes, aparecen algunos nanohilos aislados.

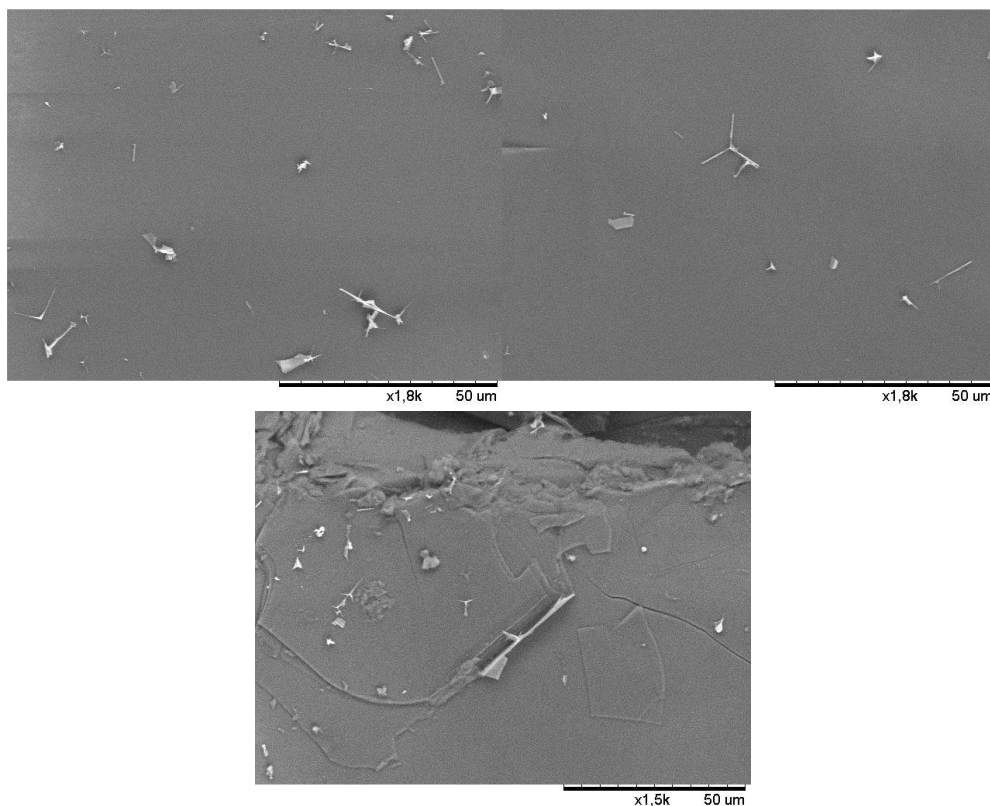


Fig. 3.18. Imagen SEM de una placa de mica modificada con una dispersión de ZnO NWs 0.5 mg mL^{-1} , previamente sonicado 10 minutos.

Posteriormente, se aplicó BPE&UV al 50%, 0.5 KV durante 10 s sobre la misma placa. En la figura 3.19 se presenta la imagen SEM obtenida tras el experimento, donde, como se puede observar, no se aprecia ningún nanohilo de ZnO modificado con oro.

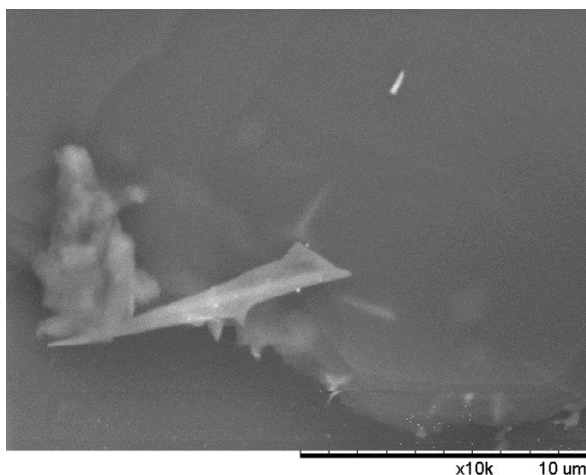


Fig. 3.19. Imagen SEM obtenida tras la aplicación de BPE&UV 50% ,0.5 KV durante 10 s sobre una placa de mica modificada con ZnO NWs sumergida en una disolución de HAuCl_4 2mM.

Se realizó el mismo experimento incrementando el tiempo de aplicación de BPE&UV a 60 s, en las mismas condiciones de potencia de la lámpara y diferencia de potencial aplicado (50% y 0.5 KV). En este caso, la imagen SEM obtenida, figura 3.20, presenta depósito metálico por toda la nanoestructura.

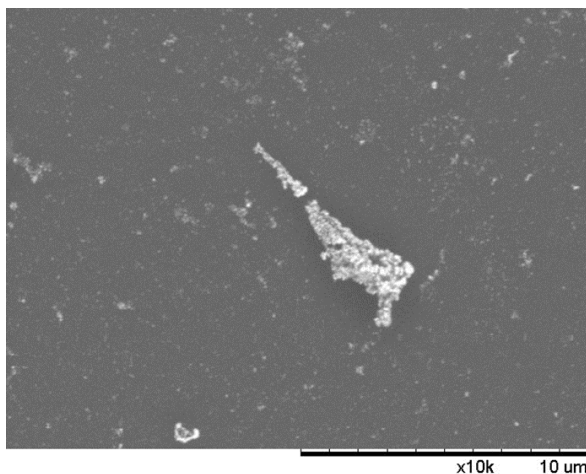


Fig. 3.20. Imagen SEM obtenida tras la aplicación de BPE&UV 50% ,0.5 KV durante 60 s sobre una placa de mica modificada con ZnO NWs sumergida en HAuCl_4 2mM.

Por tanto, para intentar obtener un depósito más localizado y asimétrico, se redujo el tiempo a 30 s manteniendo el resto de condiciones iguales. La figura 3.21 muestra la imagen de SEM obtenida tras el experimento, donde se puede apreciar depósito asimétrico sobre el nanohilo. En concreto, se pueden ver pequeñas partículas, más brillantes, sobre la parte ancha de la nanoestructura, correspondientes con oro metálico depositado.

La imagen obtenida confirma que mediante esta técnica puede obtenerse la modificación asimétrica de nanohilos de ZnO con depósitos metálicos, abriendo nuevos campos de aplicación para este nanomaterial.

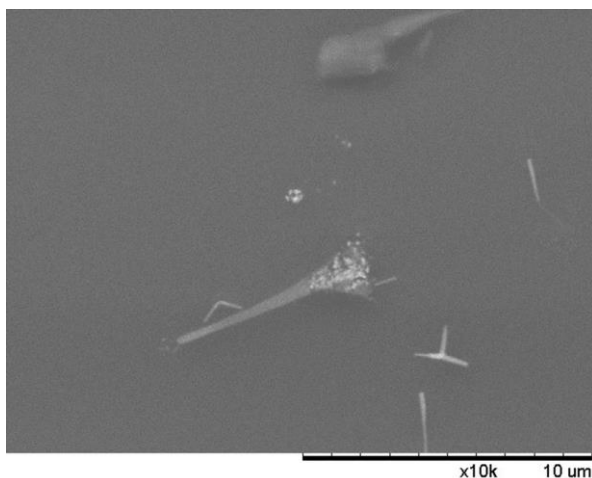


Fig. 3.21. Imagen SEM obtenida tras la aplicación de BPE&UV 50%, 0.5 KV durante 30 s sobre una placa de mica modificada con ZnO NWs sumergida en una disolución de HAuCl_4 2mM.

A decorative graphic consisting of a horizontal line and a vertical line intersecting to form a crosshair, centered on the page.

CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

CONCLUSIONES

•Se ha modificado la superficie de electrodos de oro con dos tipos de nanopartículas de diamante (DNPs), de distinto tamaño, empleando dos estrategias distintas, la inmovilización por adsorción directa y la integración de las nanopartículas de diamante en una red tridimensional tipo sol-gel. Las superficies resultantes se han caracterizado empleando distintas técnicas. Se comprobó que las DNPs muestran actividad electrocatalítica, debido a los grupos funcionales con insaturaciones presentes en su superficie.

•Se ha estudiado la respuesta de los electrodos de oro modificados con DNPs a un mediador redox, el hidroximetil ferroceno (HMF). El electrodo modificado con las nanopartículas pequeñas presenta, además de la respuesta redox característica del HMF, un proceso irreversible, a menor potencial que el correspondiente al HMF, debido a un proceso de adsorción.

•Se han desarrollado los biosensores 2D de glucosa y lactato inmovilizando la enzima, glucosa oxidasa (GOx) o lactato oxidasa (LOx), sobre el electrodo modificado con las DNPs por adsorción directa. Se caracterizaron las distintas etapas del desarrollo de los biosensores mediante distintas técnicas. En todos los casos se obtuvieron buenas reproducibilidades y límites de detección.

•Además, el biosensor de lactato desarrollado empleando las nanopartículas de menor tamaño permite trabajar a un potencial menor que el correspondiente al potencial redox del HMF, gracias a la presencia del pico de adsorción, ofreciendo así una ventaja a la hora de evitar posibles interferencias.

•Se ha desarrollado un biosensor 3D de lactato basado en la inmovilización tanto de las nanopartículas de diamante de mayor tamaño como del elemento de reconocimiento, la lactato oxidasa, en una red tipo sol-gel. Como en el caso anterior, se caracterizaron las etapas del desarrollo del biosensor mediante

distintas técnicas. Se obtuvo una buena reproducibilidad y un buen límite de detección. Además, como se esperaba, se obtuvo una mejora importante en la estabilidad de biosensor frente al modificado por adsorción directa.

- Por último, los biosensores 2D y 3D de lactato desarrollados se aplicaron para la detección de lactato en muestras reales de vino y suero humano comercial, realizando, únicamente, una dilución, en el caso de la muestra de vino, y desproteinizando y diluyendo en el caso del suero.

- Por otro lado, se ha empleado la fotoluminiscencia (PL) del óxido de zinc (ZnO NWs) para el desarrollo de un método óptico para la detección de lactato. Se caracterizó tanto el ZnO NWs como el bioconjugado formado con la enzima, la lactato oxidasa (ZnO NWs-LOx), mediante distintas técnicas, observándose interacción entre el nanomaterial y la enzima.

- Se ha estudiado el efecto de la adición de concentraciones crecientes de lactato sobre la PL del bioconjugado ZnO NWs-LOx, observándose un efecto de amortiguación de la intensidad PL. Debido a la poca solubilidad del ZnO NWs en medio acuoso, la reproducibilidad obtenida es variable, sin embargo, se obtuvo un límite de detección comparable con los reportados en la bibliografía.

- También se han empleado DNPs dopadas con boro (DNPsB) y el ZnO NWs como electrodos bipolares para su modificación asimétrica empleando la electroquímica bipolar combinada con UV (BPE&UV).

- Las DNPsB se observaron tras el tratamiento con BPE&UV, mediante AFM, y SEM. Mediante AFM se observó un depósito rugoso sobre un cúmulo de DNPsB, consistente con un depósito metálico. Las imágenes de SEM presentan agregados de nanopartículas con unas zonas más brillantes que otras, sin embargo, no se pudo confirmar la modificación asimétrica de las DNPsB.

- Se trató el ZnO NWs con BPE&UV empleando dos estrategias, con el nanomaterial en disolución o depositado sobre una placa de mica. La imagen de

SEM obtenida tras la aplicación de BPE&UV presenta un nanohilo modificado asimétricamente, confirmando la idoneidad del uso de esta técnica para la modificación asimétrica de los ZnO NWs.

Conclusions

- Gold electrodes surfaces have been modified with two types of diamond nanoparticles (DNPs), of different sizes, employing two different strategies, immobilization by direct adsorption and integration of the diamond nanoparticles in a three-dimensional sol-gel network. The resulting surfaces have been characterized using different techniques. It was found that DNPs show electrocatalytic activity, due to the unsaturated functional groups present on their surface.
- DNPs modified electrodes response toward a redox mediator, hydroxymethyl ferrocene (HMF), has been studied. The small-nanoparticles-modified electrodes present, in addition to the characteristic redox response of HMF, an irreversible process, at lower potential than the corresponding to HMF, due to an adsorption process.
- 2D glucose and lactate biosensors were developed by immobilizing the enzyme, glucose oxidase (GOx) or lactate oxidase (LOx), onto the electrochemical platform DNPs / Au by direct adsorption. The different stages of biosensor development were characterized by different techniques. In all cases, good reproducibility and detection limits were obtained.
- In addition, the developed lactate biosensor using the small nanoparticles allows to work at a potential lower than the corresponding to HMF, thanks to the presence of the adsorption peak, thus offering the advantage of avoiding possible interferences.
- A 3D lactate biosensor was developed based on the immobilization of both the larger diamond nanoparticles and the recognition element, lactate oxidase, in a sol-gel network. As in the previous case, the stages of the biosensor development were characterized by different techniques. Good reproducibility and a good detection

limit were obtained. In addition, as expected, a great improvement in the biosensor stability was obtained over the modified by direct adsorption one.

- Finally, the developed 2D and 3D lactate biosensors were applied to the detection of lactate in real samples of wine and commercial human serum, carrying out only a dilution, in the case of the wine sample, and deproteinization and dilution it in the case of serum.

- On another front, photoluminescence (PL) of zinc oxide nanowires (ZnO NWs) have been used for the development of an optical method for lactate analysis. Both ZnO NWs and the bioconjugate formed with the enzyme, lactate oxidase (ZnO NWs-LOx), were characterized by different techniques. A interaction between the nanomaterial and the enzyme was observed.

- The effect of the addition of increasing lactate concentrations on bioconjugate ZnO NWs-LOx PL has been studied. A quenching effect of the signal was observed. Due to the low solubility of ZnO in aqueous medium, the reproducibility obtained is variable, however, a detection limit comparable to those reported in the literature was obtained.

- DNPs doped with boron (DNPsB) and ZnO NWs have been used as bipolar electrodes for asymmetric modification using bipolar electrochemistry combined with UV (BPE & UV).

- DNPsB treated with BPE & UV were observed by AFM and SEM. A rough deposit on a DNPsB cluster was observed, consistent with a metallic deposit. SEM images show nanoparticles aggregates with areas brighter than others, but DNPsB asymmetric modification could not be confirmed.

- ZnO NWs were treated with BPE & UV using two strategies, with the nanomaterial in solution or by immobilization on a mica plate. SEM image obtained after applying BPE & UV presents an asymmetrically modified nanowire, confirming the suitability of using this technique to obtain asymmetrically modified nanomaterials.

BIBLIOGRAFÍA

A

[**Abu-Salah, 2010**] Abu-Salah, K.M., Alrokyan, S.A.; Khan, M.N.; Ansari, A.A., Nanomaterials as analytical tools for genosensors, *Sensors*, 2010, 10, 963.

[**Aggarwal, 2009**] Aggarwal, P., Hall, J.B.; McLeland, C.B.; Dobrovolskaia, M.A.; McNeil, S.E., Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2009, 61, 428.

[**Agüí, 2008**] Agüí, L., Yáñez-Sedeño, P.; Pingarrón, J.M., Role of carbon nanotubes in electroanalytical chemistry. A review, *Anal. Chim. Acta*, 2008, 622, 11.

[**Aleksenskii, 1999**] Aleksenskii, A.E., Baidakova, M.V.; Vul', A.Y.; Siklitskii, V.I., The structure of diamond nanoclusters, *Phys. Solid State*, 1999, 41, 668.

[**Allen, 2010**] Allen, M.J., Tung, V.C.; Kaner, R.B., Honeycomb carbon: A review of graphene, *Chem. Rev.*, 2010, 110, 132.

[**Andersson-Engels, 1994**] Andersson-Engels, S., Johansson, J.; Svanberg, S., Medical diagnostic system based on simultaneous multispectral fluorescence imaging, *Appl. Opt.*, 1994, 33, 8022.

[**Ansari, 2010**] Ansari, A.A., Kaushik, A.; Solanki, P.R.; Malhotra, B.D., Nanostructured zinc oxide platform for mycotoxin detection, *Bioelectrochemistry*, 2010, 77, 75.

[**Antiochia, 1997**] Antiochia, R., Cass, A.E.G.; Palleschi, G., Purification and sensor applications of an oxygen insensitive, thermophilic diaphorase, *Anal. Chim. Acta*, 1997, 345, 17.

[**Arguello, 1969**] Arguello, C.; Rousseau, D.; Porto, S.P.S., First-order Raman effect in wurtzite-type crystals, *Phys. Rev.*, 1969, 181, 1351.

[**Arora, 2001**] Arora, A., Eijkel, J.T.C.; Morf, W.E.; Manz, A., A wireless electrochemiluminescence detector applied to direct and indirect detection for electrophoresis on a microfabricated glass device, *Anal. Chem.*, 2001, 73, 3282.

[**Arroyo, 1998**] Arroyo, M., Inmovilización de enzimas: Fundamentos, métodos y aplicaciones, *Ars Pharmaceutica*, 1998, 39, 23.

B

[**Baduí, 1999**] Baduí, S., Química de los alimentos, *Ed. Pearson Educación*, 1999.

[Bakker, 1996] Bakker, J., Gris, P.; Coffernils, M.; Kahn, R.J.; Vincent, J.L., Serial blood lactate levels can predict the development of multiple organ failure following septic shock, *Am. J. Surg.*, 1996, 171, 221.

[Bakthavathsalam, 2012] Bakthavathsalam, P., Rajendran, V.K.; Mohammed, J.A.B., A direct detection of *escherichia coli* genomic DNA using gold nanoprobe, *J. Nanobiotechnol.*, 2012, 10, 8.

[Ballesta-Claver, 2008] Ballesta-Claver, J., Valencia-Mirón, M.C.; Capitán-Vallvey, L.F., One-shot lactate chemiluminescent biosensor, *Anal. Chim. Acta*, 2008, 629, 136.

[Bankar, 2009] Bankar, S.B., Glucose oxidase — an overview, *Biotechnol. Adv.*, 2009, 27, 489.

[Bhushan, 2014] Bhushan, B., Luo, D.; Schrick, S.R.; Sigmund, W.; Zauscher, S., Handbook of nanomaterials properties, *Ed. Springer*, 2014.

[Bo, 2011] Bo, Y., Yang, H.; Hu, Y.; Yao, T.; Huang, S., A novel electrochemical DNA biosensor based on graphene and polyaniline nanowires, *Electrochim. Acta*, 2011, 56, 2676.

[Bondar', 2004] Bondar', V.S., Pozdnyakova, I.O.; Puzyr', A.P., Applications of nanodiamonds for separation and purification of proteins, *Phys.Solid. State*, 2004, 46, 758.

[Boujtita, 1996] Boujtita, M., Chapleau, M.; Murr, N.E., Enzymatic electrode for the determination of L-lactate, *Electroanal.*, 1996, 8, 485.

[Bourdillon, 1980] Bourdillon, C., Bourgeois, J.P.; Thomas, D., Covalent linkage of glucose oxidase on modified glassy-carbon electrodes kinetic phenomena, *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, 102, 4231.

[Broder, 1964] Broder, G., Weil, M.H., Excess lactate - index of reversibility of shock in human patients, *Science*, 1964, 143, 1457.

[Burmeister, 2005] Burmeister, J.J., Palmer, M.; Gerhardt, G.A., L-lactate measures in brain tissue with ceramic-based multisite microelectrodes, *Biosens. Bioelectron.*, 2005, 20, 1772.

C

[Cadena, 2013] Cadena, M.J., Misiego, R.; Smith, K.C.; Avila, A.; Pipes, B.; Reifemberger, R.; Raman, A., Sub-surface imaging of carbon nanotube–polymer composites using dynamic AFM methods, *Nanotechnology*, 2013, 24, 135706.

- [Carbone, 2010]** Carbone, L., Cozzoli, P.D., Colloidal heterostructured nanocrystals: Synthesis and growth mechanisms, *Nano Today*, 2010, 5, 449.
- [Casero, 2013]** Casero, E., Alonso, C.; Vázquez, L.; Petit-Domínguez, M.D.; Parra-Alfambra, A.M.; De la Fuente, M.; Merino, P., Comparative response of biosensing platforms based on synthesized graphene oxide and electrochemically reduced graphene, *Electroanal.*, 2013, 25, 154.
- [Chaaya, 2014a]** Chaaya, A.A., Bechelany, M.; Balme, S.; Miele, P., ZnO 1D nanostructures designed by combining atomic layer deposition and electrospinning for UV sensor applications, *J. Mater. Chem. A*, 2014a, 2, 20650.
- [Chaaya, 2014b]** Chaaya, A.A., Viter, R.; Baleviciute, I.; Bechelany, M.; Ramanavicius, A.; Gertnere, Z.; Erts, D., Tuning optical properties of $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZnO}$ nanolaminates synthesized by atomic layer deposition, *J. Phys. Chem. C*, 2014b, 118, 3811.
- [Chang, 2008]** Chang, Y.R., Lee, H.Y.; Chen, K.; Chang, C.C.; Tsai, D.S.; Fu, C.C.; Lim, T.S., Mass production and dynamic imaging of fluorescent nanodiamonds, *Nat. Nanotechnol.*, 2008, 3, 284.
- [Chao, 2007]** Chao, J.I., Perevedentseva, E.; Chung, P.H.; Liu, K.K.; Cheng, C.Y.; Chang, C.C.; Cheng, C.L., Nanometer-sized diamond particle as a probe for biolabeling, *Biophys. J.*, 2007, 93, 2199.
- [Chaturvedi, 2014]** Chaturvedi, P., Vanegas, D.C.; Taguchi, M.; Burrs, S.L.; Sharma, P.; McLamore, E.S., A nanoceria–platinum–graphene nanocomposite for electrochemical biosensing, *Biosens. Bioelectron.*, 2014, 58, 179.
- [Chaubey, 2002]** Chaubey, A., Malhotra, B.D., Mediated biosensors, *Biosens. Bioelectron.*, 2002, 17, 441.
- [Chen, 2006]** Chen, C.Q., Shi, Y.; Zhang, Y.S.; Zhu, J.; Yan, Y.J., Size dependence of young's modulus in ZnO nanowires, *Phys. Rev. Lett.*, 2006, 96, 075505.
- [Chestnoy, 1986]** Chestnoy, N., Harris, T.D.; Hull, R.; Brus, L.E., Luminescence and photophysics of CdS semiconductor clusters: The nature of the emitting electronic state, *J. Phys. Chem.*, 1986, 90, 3393.
- [Choi, 2004]** Choi, M.M.F., Progress in enzyme-based biosensors using optical transducers, *Microchim. Acta*, 2004, 148, 107.

- [Chopra, 2007]** Chopra, N., Gavalas, V.G.; Bachas, L.G.; Hinds, B.J.; Bachas, L.G., Functional one-dimensional nanomaterials: Applications in nanoscale biosensors, *Anal. Lett.*, 2007, 40, 2067.
- [Chung, 2006]** Chung, P.H., Perevedentseva, E.; Tu, J.S.; Chang, C.C.; Cheng, C.L., Spectroscopic study of bio-functionalized nanodiamonds, *Diamond Relat. Mater.*, 2006, 15, 622.
- [Cimpoiasu, 1996]** Cimpoiasu, A., Van der Pers, M.N.; De Keyserd, T.H.; Venema, A.; Vellekoop, M.J., Stress control of piezoelectric ZnO films on silicon substrates, *Smart Mater. Struct.*, 1996, 5, 744.
- [Collings, 1997]** Collings, A.F., Caruso, F., Biosensors: Recent advances, *Rep. Prog. Phys.*, 1997, 60, 1397.
- [Conley, 2005]** Conley, F., Stecker, L.; Ono, Y., Direct assembly of ZnO nanowires on a si substrate without a metal catalyst using a patterned ZnO seed layer, *Nanotechnology*, 2005, 16, 292.
- [Costi, 2010]** Costi, R., Saunders, A.E.; Banin, U., Colloidal hybrid nanostructures: A new type of functional materials, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, 49, 4878.
- [Crossfie, 1974]** Crossfie, M., Davies, G.; Collins, A.T.; Lightowl, E.C., Role of defect interactions in reducing decay time of H-3 luminescence in diamond, *J. Phys. C Solid State*, 1974, 7, 1909.
- [Crossley, 2010]** Crossley, S., Faria, J.; Shen, M.; Resasco, D.E., Solid nanoparticles that catalyze biofuel upgrade reactions at the water/oil interface, *Science*, 2010, 327, 68.
- [Cui, 2005]** Cui, D.X., Tian, F.R.; Ozkan, C.S.; Wang, M.; Gao, H.J., Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells, *Toxicol. Lett.*, 2005, 155, 73.

D

- [D'Souza, 2001]** D'Souza, S.F., Microbial biosensors, *Biosens. Bioelectron.*, 2001, 16, 337.
- [Danilenko, 2004]** Danilenko, V.V., On the history of the discovery of nanodiamond synthesis, *Phys. Solid State*, 2004, 46, 595.
- [Dai, 2002]** Dai, Y.; Zhang, Y.; Li, Q.K.; Nan, C.W., Synthesis and optical properties of tetrapod like zinc oxide nanorods, *Chem. Phys. Lett.*, 2002, 358, 83.

- [Das, 2013]** Das, M., Goswami, P., Direct electrochemistry of alcohol oxidase using multiwalled carbon nanotube as electroactive matrix for biosensor application, *Bioelectrochemistry*, 2013, 89, 19.
- [Decremps, 2002]** Decremps, F.; Pellicer-Porres, J.; Saitta, A.M.; Chervin, J.C.; Polian, A., High-pressure Raman spectroscopy study of wurtzite ZnO, *Phys. Rev. B.*, 2002, 65, 092101.
- [De Luca, 2005]** De Luca, S., Florescu, M.; Ghica, M.E.; Lupu, A.; Palleschi, G.; Brett, C.M.A.; Compagnone, D., Carbon film electrodes for oxidase-based enzyme sensors in food analysis, *Talanta*, 2005, 68, 171.
- [De Marcos, 1995]** De Marcos, S., Galban, J.; Castillo, J.R., An enzyme fluorescence quenching method for the determination of lactate in synthetic blood serum, *Anal. Sci.*, 1995, 11, 233.
- [Deng, 2012]** Deng, H., Xu, Y.; Liu, Y.; Che, Z.; Guo, H.; Shan, S.; Sun, Y., Gold nanoparticles with asymmetric polymerase chain reaction for colorimetric detection of DNA sequence, *Anal. Chem.*, 2012, 84, 1253.
- [Dobrovolskaia, 2008]** Dobrovolskaia, M.A., Aggarwal, P.; Hall, J.B.; McNeil, S.E., Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution, *Mol. Pharm.*, 2008, 5, 487.
- [Dobrovolskaia, 2007]** Dobrovolskaia, M.A., McNeil, S.E., Immunological properties of engineered nanomaterials, *Nat. Nanotechnol.*, 2007, 2, 469.
- [Dorfman, 2006]** Dorfman, A., Kumar, N.; Hahm, J., Highly sensitive biomolecular fluorescence detection using nanoscale ZnO platforms, *Langmuir*, 2006, 22, 4890.
- [Duchen, 1992]** Duchen, M.R., Biscoe, T.J., Mitochondrial function in type I cells isolated from rabbit arterial chemoreceptors, *J. Physiol.*, 1992, 450, 13.
- [Duval, 2001]** Duval, J., Kleijn, J.M.; Van Leeuwen, H.P., Bipolar electrode behaviour of the aluminium surface in a lateral electric field, *J. Electroanal. Chem.*, 2001, 505, 1.

E

- [Eatemadi, 2014]** Eatemadi, A., Daraee, H.; Karimkhanloo, H.; Kouhi, M.; Zarghami, N.; Akbarzadeh, A.; Abasi, M., Carbon nanotubes: Properties, synthesis, purification, and medical applications, *Nanoscale Research Letters*, 2014, 9, 393.

[Eggins, 1996] Eggins, B.R., Biosensors: An introduction, *Ed. Wiley*, 1996.

[Ekimov, 2015] Ekimov, E., Kudryavstev, O.; Khomich, O.; Lebedev, O.; Dolenko, T.; Vlasov, I., High pressure synthesis of boron-doped ultrasmall diamonds from an organic compound, *Adv. Mater.*, 2015, 27, 5518.

[Elhag, 2015] Elhag, S., Ibupoto, Z.H.; Khranovskyy, V.; Willander, M.; Nur, O., Habit-modifying additives and their morphological consequences on photoluminescence and glucose sensing properties of ZnO nanostructures, grown via aqueous chemical synthesis, *Vacuum*, 2015, 116, 21.

[Elias, 2012] Elias, J., Bechelany, M.; Utke, I.; Erni, R.; Hosseini, D.; Michler, J.; Philippe, L., Urchin-inspired zinc oxide as building blocks for nanostructured solar cells, *Nano Energy*, 2012, 1, 696.

F

[Ferrari, 2001] Ferrari, A.C., Robertson, J., Resonant raman spectroscopy of disordered, amorphous, and diamondlike carbón, *Phys. Rev. B*, 2001, 64, 075414.

[Ferrari, 2000] Ferrari, A.C., Robertson, J., Interpretation of raman spectra of disordered and amorphous carbon, *Phys. Rev. B*, 2000, 61, 14095.

[Ferri, 2011] Ferri, S., Kojima, K.; Sode, K., Review of glucose oxidases and glucose deshydrogenases: A bird's eye view of glucose sensing enzymes, *J.Diabetes Sci.Technol.*, 2011, 5, 1068.

[Finklea, 1996] Finklea, H.O., Electroanalytical chemistry: A series of advances, *CRC Press*, 1996, 19, 109.

[Fischer, 2007] Fischer, H.C., Chan, W.C.W., Nanotoxicity: The growing need for in vivo study, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2007, 18, 565.

[Fosdick, 2013] Fosdick, S.E., Knust, K.N.; Scida, K.; Crooks, R.M., Bipolar electrochemistry, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, 52, 10438.

[Frenklach, 1989] Frenklach, M., Kematich, R.; Huang, D.; Howard, W.; Spear, K.E.; Phelps, A.W.; Koba, R., Homogeneous nucleation of diamond powder in the gas-phase, *J. Appl. Phys.*, 1989, 66, 395.

[Fu, 2009] Fu, C., Yang, W.; Chen, X.; Evans, D.G., Direct electrochemistry of glucose oxidase on a graphite nanosheet–Nafion composite film modified electrode, *Electrochemistry Communications*, 2009, 11, 997.

G

[Gaebel, 2004] Gaebel, T., Popa, I.; Gruber, A.; Domhan, M.; Jelezko, F.; Wrachtrup, J., Stable single-photon source in the near infrared, *New J. Phys.*, 2004, 6, 98.

[Galant, 2015] Galant, A.L., Kaufman, R.C., Glucose: Detection and analysis, *Food Chem.*, 2015, 188, 149.

[Galbán, 1993] Galbán, J., Demarcos, S.; Castillo, J.R., Fluorometric–enzymatic lactate determination based on enzyme cytochrome b2 fluorescence, *Anal. Chem.*, 1993, 65, 3076.

[Galus, 1991] Galus, Z., Fundamentals of electrochemical analysis, *Ed. Ellis Horwood*, 1991.

[Gangwal, 2008] Gangwal, S., Cayre, O.J.; Velez, O.D., Dielectrophoretic assembly of metallodielectric janus particles in AC electric fields, *Langmuir*, 2008, 24, 13312.

[Gao, 2015] Gao, H., Duan, H., 2D and 3D graphene materials: Preparation and bioelectrochemical applications, *Biosens. Bioelectron.*, 2015, 65, 404.

[García, 2015] García Nuñez, C., 2015, Contribution to the development of electronic devices based on Zn₃N₂ thin films and ZnO and GaAs nanowires. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, Departamento de Física Aplicada, Madrid.

[Garjonyte, 2006] Garjonyte, R., Melvydas, V.; Malinauskas, A., Mediated amperometric biosensors for lactic acid based on carbon paste electrodes modified with baker's yeast *saccharomyces cerevisiae*, *Bioelectrochemistry*, 2006, 68, 191.

[Gilson, 2016] Gilson, G.S., Native glucose oxidase does not undergo direct electron transfer biosens, *Biosens. Bioelectron.*, 2016, 82, vii.

[Glotzer, 2007] Glotzer, S.C., Solomon, M., Anisotropy of building blocks and their assembly into complex structures, *J. Nat. Mater.*, 2007, 6, 557.

[Greiner, 1988] Greiner, N.R., Phillips, D.S.; Johnson, J.D.; Volk, F., Diamonds in detonation soot, *Nature*, 1988, 333, 440.

[Grieshaber, 2008] Grieshaber, D., MacKenzie, R.; Vörös, J.; Reimhult, E., Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures, *Sensors*, 2008, 8, 1400.

[Groegel, 2011] Groegel, D.B.M., Link, M.; Duerkop, A.; Wolfbeis, O.S., A new fluorescent PET probe for hydrogen peroxide and its use in enzymatic assays for L-lactate and D-glucose, *ChemBiochem*, 2011, 12, 2779.

[Gruber, 1997] Gruber, A., Drabenstedt, A.; Tietz, C.; Fleury, L.; Wrachtrup, J.; Von Borczyskowski, C., Scanning confocal optical microscopy and magnetic resonance on single defect centers, *Science*, 1997, 276, 2012.

[Gu, 2011] Gu, B., Xu, C.; Yang, C.; Liu, S.; Wang, M., ZnO quantum dot labeled immunosensor for carbohydrate antigen 19-9, *Biosens. Bioelectron.*, 2011, 26, 2720.

[Guerrero, 2012] Guerrero, S., Herance, R.; Rojas, S.; Mena, J.; Gispert, J.; Acosta, G.; Albericio, P., Synthesis and in vivo evaluation of the biodistribution of a 18 F labeled conjugate gold-nanoparticle-peptide with potential biomedical application, *Bioconjug. Chem.*, 2012, 23, 399.

[Gupta A.K., 2005] Gupta, A.K., Gupta, M., Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications, *Biomaterials*, 2005, 26, 3995.

[Gupta R., 2007] Gupta, R., Chaudhury, N.K., Entrapment of biomolecules in sol–gel matrix for applications in biosensors: Problems and future prospects, *Biosens. Bioelectron.*, 2007, 22, 2387.

H

[Hanley, 2008] Hanley, C., Layne, J.; Punnoose, A.; Reddy, K.M.; Coombs, I.; Coombs, A.; Feris, K., Preferential killing of cancer cells and activated human T cells using ZnO nanoparticles, *Nanotechnology*, 2008, 19, 295103.

[Hao, 2010] Hao, R., Xing, R.; Xu, Z.; Hou, Y.; Gao, S.; Sun, S., Synthesis, functionalization, and biomedical applications of multifunctional magnetic nanoparticles, *Adv. Mater.*, 2010, 22, 2729.

[Harley, 1984] Harley, R.T., Henderson, M.J.; Macfarlane, R.M., Persistent spectral hole burning of color-centers in diamond, *J. Phys. C Solid State*, 1984, 17, L233.

[Hart, 2004] Hart, J.P., Crew, A.; Crouch, E.; Honeychurch, K.C.; Pemberton, R.M., Some recent designs and developments of screen-printed carbon electrochemical

sensors/biosensors for biomedical, environmental, and industrial analyses, *Anal. Lett.*, 2004, 37, 789.

[Haruvy, 1991] Haruvy, Y., Webber, S.E., Supported sol-gel thin-film glasses embodying laser-dyes .1. A new fast method for the preparation of optically clear polysiloxane thin-film glasse, *Chem. Mater.*, 1991, 3, 501.

[Hasselbarth, 1993] Hasselbarth, A., Eychmuller, A.; Weller, H., Detection of shallow electron traps in quantum sized CdS by fluorescence quenching experiments, *Chem. Phys. Lett.*, 1993, 203, 271.

[Heath, 1998] Heath, J.R., Shiang, J.J., Covalency in semiconductor quantum dots, *Chem. Soc. Rev.*, 1998, 27, 65.

[Holt, 2010] Holt, K.B., Undoped diamond nanoparticles: Origins of surface redox chemistry, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2010, 12, 2048.

[Holt, 2009] Holt, K.B., Caruana, D.J.; Millán-Barrios, E.J., Electrochemistry of undoped diamond nanoparticles: Accessing surface redox states, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131, 11272.

[Holzinger, 2014] Holzinger, M., Goff, A.L.; Cosnier, S., Nanomaterials for biosensing applications: A review, *Front. Chem.*, 2014, 2, 63.

[Hong, 2010] Hong, X., Chu, X.; Zou, P.; Liu, Y.; Yang, G., Magnetic-fieldassisted rapid ultrasensitive immunoassays using $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZnO}/\text{Au}$ nanorices as raman probes, *Biosens. Bioelectron.*, 2010, 26, 918.

[Hu, 2007] Hu, H., Huang, X.; Deng, C.; Chen, X.; Qian, Y., Hydrothermal synthesis of ZnO nanowires and nanobelts on large scale, *Mater. Chem. Phys.*, 2007, 106, 58.

[Huang H.J., 2008a] Huang, H.J., Pierstorff, E.; Osawa, E.; Ho, D., Protein-mediated assembly of nanodiamond hydrogels into a biocompatible and biofunctional multilayer nanofilm, *ACS Nano*, 2008a, 2, 203.

[Huang H.J., 2008b] Huang, H.J., Dai, L.M.; Wang, D.H.; Tan, L.S.; Osawa, E., Large-scale self-assembly of dispersed nanodiamonds, *J. Mater. Chem.*, 2008b, 18, 1347.

[Huang M.H., 2001] Huang, M.H., Wu, Y.; Feick, H.; Tran, N.; Weber, E.; Yang, P., Catalytic growth of zinc oxide nanowires by vapor transport, *Adv. Mater.*, 2001, 13, 113.

[Huang T.S., 2004] Huang, T.S., Tzeng, Y.; Liu, Y.K.; Chen, Y.K.; Walker, K.R.; Guntupalli, R.; Liu, C., Immobilization of antibodies and bacterial binding on nanodiamond and carbon nanotubes for biosensor applications, *Diamond Relat. Mater.*, 2004, 13, 1098.

I

[Iijima, 1991] Iijima, S., Helical microtubules of graphitic carbon, *Nature*, 1991, 354, 56.

[Iwuoha, 1999] Iwuoha, E.I., Rock, A.; Smyth, M.R., Amperometric L-lactate biosensors: 1. lactic acid sensing electrode containing lactate oxidase in a composite poly-L-lysine matrix, *Electroanal.*, 1999, 11, 367.

[Iwuoha, 1997] Iwuoha, E.I., Reactivities of organic phase biosensors. 2. the amperometric behaviour of horseradish peroxidase immobilised on a platinum electrode modified with an electrosynthetic polyaniline film, *Biosens. Bioelectron.*, 1997, 12, 749.

J

[Janek, 1998] Janek, R.P., Fawcett, W.R., Impedance spectroscopy of self-assembled monolayers on au (111): Sodium ferrocyanide charge transfer at modified electrodes, *Langmuir*, 1998, 14, 3011.

[Jena, 2007] Jena, B.K., Raj, C.R., Amperometric l-lactate biosensor based on gold nanoparticles, *Electroanal.*, 2007, 19, 816.

[Jena, 2006] Jena, B.K., Raj, C.R., Electrochemical biosensor based on integrated assembly of dehydrogenase enzymes and gold nanoparticles, *Anal. Chem.*, 2006, 78, 6332.

[Jesionowski, 2014] Jesionowski, T., Zdarta, J.; Krajewska, B., Enzyme immobilization by adsorption: A review, *Adsorption*, 2014, 20, 801.

[Jia, 2005] Jia, G., Wang, H.F.; Yan, L.; Wang, X.; Pei, R.J.; Yan, T.; Zhao, Y.L., Cytotoxicity of carbon nanomaterials: Single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene, *Environ. Sci. Technol.*, 2005, 39, 1378.

[Jiang, 2014] Jiang, D., Tian, C.; Liu, Q.; Zhao, M.; Qin, J.; Hou, J.; Gao, S., Young's modulus of individual ZnO nanowires, *Mater. Sci. Eng. A*, 2014, 610, 1.

[John, 2002] John, P., Polwart, N.; Troupe, C.E.; Wilson, J.I.B., The oxidation of (100) textured diamond, *Diamond Relat. Mater.*, 2002, 11, 861.

[Johnson, 2011] Johnson, K.A., Goody, R.S., The original michaelis constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten paper, *Biochemistry*, 2011, 50, 8264.

[Jung, 2010] Jung, J.H., Cheon, D.S.; Liu, F.; Lee, K.B.; Seo, T.S., A graphene oxide based immuno-biosensor for pathogen detection, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, 49, 5708.

K

[Kang, 2005] Kang, B.S., Ren, F.; Heo, Y.W.; Tien, L.C.; Norton, D.P.; Pearton, S., pH measurements with single ZnO nanorods integrated with a microchannel, *J. Appl. Phys. Lett.*, 2005, 86, 112105.

[Kathiravan, 2009] Kathiravan, A.; Paramaguru, G.; Renganathan, R., Study on the binding of colloidal zinc oxide nanoparticles with bovine serum albumin, *J. Mol. Struct.*, 2009, 934, 129.

[Katz, 2004] Katz, E., Willner, I.; Wang, J., Electroanalytical and bioelectroanalytical systems based on metal and semiconductor nanoparticles, *Electroanal.*, 2004, 16, 19.

[Kemp, 2005] Kemp, G., Lactate accumulation, proton buffering, and pH change in ischemically exercising muscle, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2005, 289, R895.

[Kenausis, 1996] Kenausis, G., Taylor, C.; Katakis, I.; Heller, A., 'Wiring' of glucose oxidase and lactate oxidase within a hydrogel made with poly(vinyl pyridine) complexed with $[\text{os}(4,4'\text{-dimethoxy-2,2'-bipyridine})_2\text{Cl}]^{+2+}$, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 1996, 92, 4131.

[Khan A.A., 2010] Khan, A.A., Alzohairy, M.A., Recent advances and application of immobilized enzyme technologies, *Re. J. Biol. Sci.*, 2010, 5, 565.

[Khan G.F., 1997] Khan, G.F., Wernet, W., Design of enzyme electrodes for extended use and storage life, *Anal. Chem.*, 1997, 69, 2682.

[Khoshnevisan, 2015] Khoshnevisan, K., Barkhi, M., Zeta potential, DOI: 10.13140/RG.2.1.4554.3844, 2015.

[Khranovskyy, 2012a] Khranovskyy, V., Lazorenko, V.; Lashkarev, G.; Yakimova, R., Luminescence anisotropy of ZnO microrods, *J. Lumin.*, 2012a, 132, 2643.

- [**Khranovskyy, 2012b**] Khranovskyy, V., Yakimova, R.; Karlsson, F.; Syed, A.S.; Holtz, P.; Urgessa, Z.N.; Oluwafemi, O.S., Comparative PL study of individual ZnO nanorods, grown by APMOCVD and CBD techniques, *Physica B*, 2012b, 407, 1538.
- [**Khranovskyy, 2010**] Khranovskyy, V., Tsiaoussis, I.; Yazdi, G.R.; Hultman, L.; Yakimova, R., Heteroepitaxial ZnO nano hexagons on p-type SiC, *J. Cryst. Growth*, 2010, 312, 327.
- [**Kim J.S., 2006**] Kim, J.S., Park, W.I.; Lee, C.H.; Yi, G.C., ZnO nanorod biosensor for highly sensitive detection of specific protein binding, *J. Korean Phys. Soc.*, 2006, 49, 1635.
- [**Kim J.Y., 2011**] Kim, J.Y., Cho, J.W.; Kim, S.H., The characteristic of the ZnO nanowire morphology grown by the hydrothermal method on various surface-treated seed layers, *Mater. Lett.*, 2011, 65, 1161.
- [**Kim K., 2012**] Kim, K., Kim, T.G.; Sung, Y., Enzyme-conjugated ZnO nanocrystals for collisional quenching-based glucose sensing, *CrystEngComm.*, 2012, 14, 2859.
- [**Kim S.M., 2010**] Kim, S.M., Shen, G.; Wilbert, D.S.; Baughman, W.; Dawahre, N.; Murphy, M.; York, M., Synthesis and optical properties of ZnO nanowires for nanophotonics, *Nanotechnology (IEEE-NANO)*, 2010, 10th IEEE conference, 285.
- [**Klaumünzer, 2013**] Klaumünzer, M., Weichsel, U.; Mačković, M.; Spiecker, E.; Peukert, W.; Kryschi, C., Transmission electron microscopy and time resolved optical spectroscopy study of the electronic and structural interactions of ZnO nanorods with bovine serum albumin, *J. Phys. Chem. B*, 2013, 117, 9683.
- [**Klingshirn, 2010**] Klingshirn, C., Fallert, J.; Zhou, H.; Sartor, J.; Thiele, C.; Maier-Flaig, F.; Schneider, D., 65 years of ZnO research—old and very recent results, *Phys. Status Solidi B*, 2010, 247, 1424.
- [**Kondo, 2015**] Kondo, T., Okada, N.; Yamaguchi, Y.; Urai, J.; Aikawa, T.; Yuasa, M., Boron doped nanodiamond powder prepared solid-state diffusion method, *Chem. Lett.*, 2015, 44, 627.
- [**Kong, 2005a**] Kong, X.L., Huang, L.C.L.; Hsu, C.M.; Chen, W.H.; Han, C.C.; Chang, H.C., High-affinity capture of proteins by diamond nanoparticles for mass spectrometric analysis, *Anal. Chem.*, 2005a, 77, 259.

- [Kong, 2005b] Kong, X.L., Huang, L.C.L.; Liao, S.C.V.; Han, C.C.; Chang, H.C., Polylysine-coated diamond nanocrystals for MALDI-TOF mass analysis of DNA oligonucleotides, *Anal. Chem.*, 2005b, 77, 4273.
- [Krishnamoorthy, 2006] Krishnamoorthy, S., Bei, T.; Zoumakis, E.; Chrousos, G.P.; Iliadis, A.A., Morphological and binding properties of interleukin-6 on thin ZnO films grown on (100) silicon substrates for biosensor applications, *Biosens. Bioelectron.*, 2006, 22, 707.
- [Krueger, 2008a] Krueger, A., The structure and reactivity of nanoscale diamond, *J. Mater. Chem.*, 2008a, 18, 1485.
- [Krueger, 2008b] Krueger, A., Diamond nanoparticles: Jewels for chemistry and physics, *Adv. Mater.*, 2008b, 20, 2445.
- [Krueger, 2008c] Krueger, A., New carbon materials: Biological applications of functionalized nanodiamond materials, *Chem. Eur. J.*, 2008c, 14, 1382.
- [Krueger, 2008d] Krueger, A., Stegk, J.; Liang, Y.J.; Lu, L.; Jarre, G., Biotinylated nanodiamond: Simple and efficient functionalization of detonation diamond, *Langmuir*, 2008d, 24, 4200.
- [Kruger, 2006] Kruger, A., Liang, Y.J.; Jarre, G.; Stegk, J., Surface functionalisation of detonation diamond suitable for biological applications. *J. Mater. Chem.*, 2006, 16, 2322.
- [Krüger, 2005] Krüger, A., Kataoka, F.; Ozawa, M.; Fujino, T.; Suzuki, Y.; Aleksenskii, A.E.; Vul', Y.A., Unusually tight aggregation in detonation diamond: Identification and disintegration, *Carbon*, 2005, 43, 1722.
- [Kulakova, 2004] Kulakova, I.I., Surface chemistry of nanodiamonds, *Phys. Solid State*, 2004, 46, 621.
- [Kulkarni, 2015] Kulkarni, S.S., Optical and structural properties of zinc oxide nanoparticles, *International Journal of Advanced Research in Physical Science (IJARPS)*, 2015, 2, 14.
- [Kulys, 1993] Kulys, J., Wang, L.; Maksimoviene, A., L-lactate oxidase electrode based on methylene green and carbon paste, *Anal. Chim. Acta*, 1993, 274, 53.
- [Kumar, 2006] Kumar, N., Dorfman, A.; Hahm, J.I., Ultrasensitive DNA sequence detection using nanoscale ZnO sensor arrays, *Nanotechnology*, 2006, 17, 2875.

[Kuo, 2012] Kuo, W.S., Chang, Y.T.; Cho, K.C.; Chiu, K.C.; Lien, C.H.; Yeh, C.S.; Chen, S.J., Gold nanomaterials conjugated with indocyanine green for dual-modality photodynamic and photothermal therapy, *Biomaterials*, 2012, 33, 3270.

L

[Laia, 2017] Laia, G., Soumen, M.; Ahmed, A.; Chia-Liang, C.; Maabur, S.; Oliver, A.W., Positive zeta potential of nanodiamonds, *Nanoscale*, 2017, 9, 12549.

[Lakowicz, 2006] Lakowicz, J.R., Principles of fluorescence spectroscopy. Third edition, *Ed. Springer*, 2006.

[Lamas-Ardisana, 2014] Lamas-Ardisana, P.J., Loaiza, O.A.; Añorga, L.; Jubete, E.; Borghei, M.; Ruiz, V.; Ochoteco, E., Disposable amperometric biosensor based on lactate oxidase immobilised on platinum nanoparticle-decorated carbon nanofiber and poly(diallyldimethylammonium chloride) films, *Biosens. Bioelectron.*, 2014, 56, 345.

[Landes, 2001] Landes, C.F., Braun, M.; El-Sayed, M.A., On the nanoparticle to molecular size transition fluorescence quenching studies, *J. Phys. Chem. B.*, 2001, 105, 10554.

[Largeaud, 1995] Largeaud, F., Kokoh, K.B.; Beden, B.; Lamy, C., On the electrochemical reactivity of anomers: Electrocatalytic oxidation of α - and β -d-glucose on latinum electrodes in acid and basic media, *J. Electroanal. Chem.*, 1995, 397, 261.

[Leiros, 2006] Leiros, I., Wang, E.; Rasmussen, T.; Oksanen, E.; Repo, H.; Petersen, S.B.; Heikinheimo, P., The 2.1 Å structure of aerococcus viridans L-lactate oxidase (LOX), *Acta Crystallogr. F*, 2006, 62, 1185.

[Leonard, 2003] Leonard, P., Hearty, S.; Brennan, J.; Dunne, L.; Quinn, J.; Chakraborty, T.; O’Kennedy, R., Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water, *Enzyme Microb. Tech.*, 2003, 32, 3.

[Li J., 2006] Li, J., Uchida, T.; Ohta, T.; Todo, T.; Kitagawa, T., Characteristic structure and environment in FAD cofactor of (6-4) photolyase along function revealed by resonance raman spectroscopy, *J. Phys. Chem. B*, 2006, 110, 16724.

[Li S.Y., 2003] Li, S.Y., Lee, C.Y.; Tseng, T.Y., Copper-catalyzed ZnO nanowires on silicon (100) grown by vapor –liquid-solid process, *J.Cryst.Growth*, 2003, 247, 357.

- [Li X., 2015] Li, X., Wang, Y.; Lu, A.; Liu, X., Controllable hydrothermal growth of ZnO nanowires on cellulose paper for flexible sensors and electronics, *IEEE Sens. J.*, 2015, 15, 6100.
- [Liao, 2008] Liao, Z., Zhang, H.; Zhou, Y.; Xu, J.; Zhang, J.; Yu, D., Surface effects on photoluminescence of single ZnO nanowires, *Phys. Lett. A*, 2008, 372, 4505.
- [Lin, 2009] Lin, W.J., Liao, C.S.; Jhang, J.H.; Tsai, Y.C., Graphene modified basal and edge plane pyrolytic graphite electrodes for electrocatalytic oxidation of hydrogen peroxide and β nicotinamide adenine dinucleotide, *Electrochem. Commun.*, 2009, 11, 2153.
- [Lineweaver, 1934] Lineweaver, H., Burk, D., The determination of enzyme dissociation constants, *J. Am. Chem. Soc.*, 1934, 56, 658.
- [Liu K.K., 2008] Liu, K.K., Chen, F.; Chen, P.Y.; Lee, T.J.F.; Cheng, C.L.; Chang, C.C.; Ho, Y.P., Alpha-bungarotoxin binding to target cell in a developing visual system by carboxylated nanodiamond, *Nanotechnology*, 2008, 19, 205102.
- [Liu K.K., 2007] Liu, K.K., Cheng, C.L.; Chang, C.C.; Chao, J.I., Biocompatible and detectable carboxylated nanodiamond on human cell, *Nanotechnology*, 2007, 18, 325102.
- [Liu T., 2006] Liu, T., Liao, H.; Lin, C.; Hu, S.; Chen, S., Biofunctional ZnO nanorod arrays grown on flexible substrates, *Langmuir*, 2006, 22, 5804.
- [Liu X., 1999] Liu, X., Tan, W., Development of an optical fiber lactate sensor, *Microchim. Acta*, 1999, 131, 129.
- [Loaiza, 2015] Loaiza, O.A., Lamas-Ardisana, P.J.; Añorga, L.; Jubete, E.; Ruiz, V.; Borghei, M.; Cabañero, G., Graphitized carbon nanofiber–Pt nanoparticle hybrids as sensitive tool for preparation of screen printing biosensors. detection of lactate in wines and ciders, *Bioelectrochemistry*, 2015, 101, 58.
- [Lockridge, 1972] Lockridge, O., Massey, V.; Sullivan, P.A., Mechanism of action of the flavoenzyme lactate oxidase, *J. Biol. Chem.*, 1972, 247, 8097.
- [Loget, 2012] Loget, G., Roche, J.; Kuhn, A., True bulk synthesis of janus objects by bipolar electrochemistry, *Adv. Mater.*, 2012, 24, 5111.
- [Loktev, 1991] Loktev, V.F., Makalskii, V.I.; Stoyanova, I.V.; Kalinkin, A.V.; Likholobov, V.A.; Mitkin, V.N., Surface modification of ultradispersed diamonds, *Carbon*, 1991, 29, 817.

- [**Loubser, 1978**] Loubser, J., Vanwyk, J.A., Electron-spin resonance in study of diamond, *Rep. Prog. Phys.*, 1978, 41, 1201.
- [**Lucarelli, 2004**] Lucarelli, F., Marrazza, G.; Turner, A.P.F.; Mascini, M., Carbon and gold electrodes as electrochemical transducers for DNA hybridisation sensors, *Biosens. Bioelectron.*, 2004, 19, 515.
- [**Lucarelli, 2005**] Lucarelli, F., Marrazza, G.; Mascini, M., Enzyme-based impedimetric detection of PCR products using oligonucleotide-modified screen-printed gold electrodes, *Biosens. Bioelectron.*, 2005, 20, 2001.
- [**Luo, 2006**] Luo, X.L., Morrin, A.; Killard, A.J.; Smyth, M.R., Application of nanoparticles in electrochemical sensors and biosensors, *Electroanal.*, 2006, 18, 319.
- [**Lvovich, 2012**] Lvovich, V.F., Impedance spectroscopy: Applications to electrochemical and dielectric phenomena, *Ed. Wiley*, 2012.

M

- [**Madrid, 1999**] Madrid, J., Martínez-Teruel, A.; Hernández, F.; Megías, M.D., A comparative study on the determination of lactic acid in silage juice by colorimetric, high-performance liquid chromatography and enzymatic methods, *J. Sci. Food Agric.*, 1999, 79, 1722.
- [**Makovos, 1985**] Makovos, E.B., Liu, C.C., Measurements of lactate concentration using lactate oxidase and an electrochemical oxygen sensor, *Biotechnol. Bioeng.*, 1985, 27, 167.
- [**Marquina, 2007**] Marquina, J., Raman scattering on ZnO nanocrystals, *Rev. Mex. Fis. S.*, 2007, 53, 170.
- [**Marzouk, 1997**] Marzouk, S.A.M., Cosofret, V.V.; Buck, R.P.; Yang, H.; Cascio, W.E.; Hassan, S.S.M., A conducting salt-based amperometric biosensor for measurement of extracellular lactate accumulation in ischemic myocardium, *Anal. Chem.*, 1997, 69, 2646.
- [**Mavrè, 2010**] Mavrè, F., Anand, R.K.; Laws, D.R.; Chow, K.; Chang, B.; Crooks, J.A.; Crooks, R.M., Bipolar electrodes: A useful tool for concentration, separation, and detection of analytes in microelectrochemical systems, *Anal. Chem.*, 2010, 82, 8766.
- [**Mavrè, 2009**] Mavrè, F., Chow, K.; Sheridan, E.; Chang, B.; Crooks, J.A.; Crooks, R.M., A theoretical and experimental framework for understanding electrogenerated chemiluminescence (ECL) emission at bipolar electrodes, *Anal. Chem.*, 2009, 81, 6218.

- [**McComb, 1976**] McComb, R.B., Bond, L.W.; Burnett, R.W.; Keech, R.C.; Bowers Jr, G.N., Determination of the molar absorptivity of NADH, *Clin. Chem.*, 1976, 22, 141.
- [**Meehan, 1982**] Meehan, T.; Gamper, H.; Becker, J.F., Characterization of reversible, physical binding of benzo[a]pyrene derivatives to DNA, *J. Biol. Chem.*, 1982, 257, 10479.
- [**Melitz, 2011**] Melitz, W., Shena, J.; Kummela, A.C.; Lee, S., Kelvin probe force microscopy and its application, *Surf. Sci. Rep.*, 2011, 66, 1.
- [**Mello, 2002**] Mello, L.D., Kubota, L.T., Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries, *Food Chem.*, 2002, 77, 237.
- [**Mirsky, 1997**] Mirsky, V.M., Riepl, M.; Wolfbeis, O.S., Capacitive monitoring of protein immobilization and antigen-antibody reactions on monomolecular alkylthiol films on gold electrodes, *Biosens. Bioelectron.*, 1997, 12, 977.
- [**Mishra, 2012**] Mishra, S.K., Srivastava, R.K.; Prakash, S.G., ZnO nanoparticles: Structural, optical and photoconductivity characteristics, *J. Alloys Compd.*, 2012, 539, 1.
- [**Mochalin, 2012**] Mochalin, V.M., Shenderova, O.; Ho, D.; Gogotsi, Y., The properties and applications of nanodiamonds, *Nat. Nanotechnol.*, 2012, 7, 11.
- [**Monod, 1965**] Monod, J., Wyman, J.; Changeux, J., On the nature of allosteric transitions: A plausible model, *J. Mol. Biol.*, 1965, 12, 88.
- [**Monošík, 2012**] Monošík, R., Stredánský, M.; Šturdík, E., Biosensors — classification, characterization and new trends, *Acta Chimica Slovaca*, 2012, 5, 109.
- [**Morkoç, 2009**] Morkoç, M., Özgür, Ü, Zinc oxide: Fundamentals, materials and device technology, *Ed. Wiley*, 2009.
- [**Müller, 2001**] Müller, R.H., Jacobs, C.; Kayser, O., Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: Rationale for development and that we can expect for the future, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2001, 47, 3.
- [**Murray, 2008**] Murray, R.W., Nanoelectrochemistry: Metal nanoparticles, nanoelectrodes, and nanopores, *Chem. Rev.*, 2008, 108, 2688.
- [**Museur, 2010**] Museur, L., Michel, J.; Portes, P.; Englezis, A.; Stassinopoulos, A.; Anglos, D.; Kanaev, A.V., Femtosecond UV laser non-ablative surface structuring of ZnO crystal: Impact on exciton photoluminescence, *J. Opt. Soc. Am. B*, 2010, 27, 531.

N

[**Naahidi, 2013**] Naahidi, S., Jafari, M.; Edalat, F.; Raymond, K.; Khademhosseini, A.; Chen, P., Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery, *J. Control. Release*, 2013, 166, 182.

[**Nanduri, 2007**] Nanduri, V., Sorokulova, I.B.; Samoylov, A.M.; Simonian, A.L.; Petrenko, V.A.; Vodyanoy, V., Phage as a molecular recognition element in biosensors immobilized by physical adsorption, *Biosens. Bioelectron.*, 2007, 22, 986.

[**Natsume, 1995**] Natsume, Y., Sakata, H.; Hirayama, T., Low-temperature electrical conductivity and optical absorption edge of ZnO films prepared by chemical vapour deposition, *Phys. Status Solidi A*, 1995, 148, 485.

[**Nenkova, 2010**] Nenkova, R., Ivanova, D.; Vladimirova, J.; Godjevargova, T., New amperometric glucose biosensor based on cross-linking of glucose oxidase on silica gel/multiwalled carbon nanotubes/polyacrylonitrile nanocomposite film, *Sens. Actuators, B*, 2010, 148, 59.

[**Nguyen, 2007**] Nguyen, T.T.B., Chang, H.C.; Wu, V.W.K., Adsorption and hydrolytic activity of lysozyme on diamond nanocrystallites, *Diamond Relat. Mater.*, 2007, 16, 872.

[**Nikolaus, 2008**] Nikolaus, N., Strehlitz, B., Amperometric lactate biosensors and their application in (sports) medicine, for life quality and well being, *Microchim. Acta*, 2008, 160, 15.

[**Nisisako, 2006**] Nisisako, T., Torii, T.; Takahashi, T.; Takizawa, Y., Synthesis of monodisperse bicolored janus particles with electrical anisotropy using a microfluidic co-flow system, *Adv. Mater.*, 2006, 18, 1152.

[**Niwase, 1995**] Niwase, K., Tanaka, T.; Kakimoto, Y.; Ishihara, K.N.; Shingu, P.H., Raman-spectra of graphite and diamond mechanically milled with agate or stainless-steel ball-mill. *Mater. T. JIM*, 1995, 36, 282.

[**Nomura, 2003**] Nomura, K., Ohta, H.; Ueda, K.; Kamiya, T.; Hirano, M.; Hosono, H., Thin-film transistor fabricated in single-crystalline transparent oxide semiconductor, *Science*, 2003, 300, 1269.

[Novikov, 1999] Novikov, N.V., New trends in high-pressure synthesis of diamond, *Diamond Relat. Mater.*, 1999, 8, 1427.

[Novoselov, 2004] Novoselov, K.S.; Geim, A.K.; Morozov, S.V.; Jiang, D.; Zhang, Y.; Dubonos, S.V.; Grigorieva, I.V., Electric field effect in atomically thin carbon films, *Science*, 2004, 306, 666.

[Nunn, 2017] Nunn, N.; Torelli, M.; McGuire, G.; Shenderova, O., Nanodiamond: A high impact nanomaterial, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, 2017, 21, 1.

O

[O'Malley, 1972] O'Malley, J.J., Weaver, J.L., Subunit structure of glucose oxidase from *aspergillus niger*, *Biochemistry*, 1972, 11, 3527.

[Omole, 1999] Omole, O.O., Brocks, D.R.; Nappert, G.; Naylor, J.M.; Zello, G.A., High-performance liquid chromatographic assay of (+/-)-lactic acid and its enantiomers in calf serum, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, 1999, 727, 23.

[Ongaro, 2014] Ongaro, M., Roche, J.; Kuhn, A.; Ugo, P., Asymmetric modification of TiO₂ nanofibers with gold by electric-field-assisted photochemistry, *ChemElectroChem*, 2014, 1, 2048.

[Osswald, 2006] Osswald, S.; Yushin, G.; Mochalin, V.; Kucheyev, S.O.; Gogotsi, Y., Control of sp(2)/sp(3) carbon ratio and surface chemistry of nanodiamond powders by selective oxidation in air, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, 11635.

[Özgür, 2005] Özgür, Ü.; Alivov, Y.I.; Liu, C.; Teke, A.; Reshchikov, M.A.; Doğan, S.; Avrutin, A., A comprehensive review of ZnO materials and devices, *J. Appl. Phys.*, 2005, 98, 041301.

P

[Palanisamy, 2014] Palanisamy, S.; Karupiah, C.; Chen, S., Direct electrochemistry and electrocatalysis of glucose oxidase immobilized on reduced graphene oxide and silver nanoparticles nanocomposite modified electrode, *Colloids Surfaces B*, 2014, 114, 164.

[Palmisano, 2001] Palmisano, F.; Quinto, M.; Rizzi, R.; Zambonin, P.G., Flow injection analysis of L-lactate in milk and yoghurt by on-line microdialysis and amperometric detection at a disposable biosensor, *Analyst*, 2001, 126, 866.

- [Palmisano, 2000]** Palmisano, F., Rizzi, R.; Centonze, D.; Zambonin, P.G., Simultaneous monitoring of glucose and lactate by an interference and cross-talk free dual electrode amperometric biosensor based on electropolymerized thin films, *Biosens. Bioelectron.*, 2000, 15, 531.
- [Pancrazio, 1998]** Pancrazio, J.J., Bey Jr., P.P.; Cuttino, D.S.; Kusel, J.K.; Borkholder, D.A.; Shaffer, K.M.; Kovacs, G.T.A., Portable cell-based biosensor system for toxin detection, *Sens. Actuators, B*, 1998, 53, 179.
- [Park, 1997]** Park, T.M., Iwuoha, E.I.; Smyth, M.R.; Freaney, R.; McShane, A.J., Sol-gel based amperometric biosensor incorporating an osmium redox polymer as mediator for detection of l-lactate, *Talanta*, 1997, 44, 973.
- [Parra-Alfambra, 2011]** Parra-Alfambra, A.M., Casero, E.; Petit-Domínguez, M.D.; Barbadillo, M.; Pariente, F.; Vázquez, L.; Lorenzo, E., New nanostructured electrochemical biosensors based on three-dimensional (3-mercaptopropyl)-trimethoxysilane network, *Analyst*, 2011, 136, 340.
- [Parra-Alfambra, 2006a]** Parra-Alfambra, A.M., Casero, E.; Vázquez, L.; Pariente, F.; Lorenzo, E., Design and characterization of a lactate biosensor based on immobilized lactate oxidase onto gold surfaces, *Anal. Chim. Acta*, 2006a, 555, 308.
- [Parra-Alfambra, 2006b]** Parra-Alfambra, A.M., Casero, E.; Vázquez, L.; Jin, J.; Pariente, F.; Lorenzo, E., Microscopic and voltammetric characterization of bioanalytical platforms based on lactate oxidase, *Langmuir*, 2006b, 22, 5443.
- [Patel, 2000]** Patel, N.G., Erlenkotter, A.; Cammann, K.; Chemnitus, G.C., Fabrication and characterization of disposable type lactate oxidase sensors for dairy products and clinical analysis, *Sens. Actuators, B*, 2000, 67, 134.
- [Patel, 2002]** Patel, P.D., (Bio)sensors for measurement of analytes implicated in food safety: A review, *Trends Analyt. Chem.*, 2002, 21, 96.
- [Peng, 2011]** Peng, S., Lei, C.H.; Ren, Y.; Cook, R.E.; Sun, Y.G., Plasmonic/magnetic bifunctional nanoparticles, *Angew.Chem., Int. Ed.*, 2011, 50, 3158.
- [Perdomo, 1999]** Perdomo, J., Sundermeier, C.; Hinkers, H.; Morell, O.M.; Seifert, W.; Knoll, M., Containment sensors for the determination of L-lactate and glucose, *Biosens. Bioelectron.*, 1999, 14, 27.

- [Pereira, 2011] Pereira, A.C., Kisner, A.; Tarley, C.R.T.; Kubota, L.T., Development of a carbon paste electrode for lactate detection based on meldola's blue adsorbed on silica gel modified with niobium oxide and lactate oxidase, *Electroanal.*, 2011, 23, 1470.
- [Pérez, 2012] Pérez, S., Sánchez, S.; Fàbregas, E., Enzymatic strategies to construct l-lactate biosensors based on polysulfone/carbon nanotubes membranes, *Electroanal.*, 2012, 24, 967.
- [Perez-Juste, 2005] Perez-Juste, J., Pastoriza-Santos, I.; Liz-Marzan, L.M.; Mulvaney, P., Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications, *Coord. Chem. Rev.*, 2005, 249, 1870.
- [Petersen, 2009] Petersen, E.W., Likovich, E.M.; Russell, K.J.; Narayanamurti, V., Growth of ZnO nanowires catalyzed by size-dependent melting of au nanoparticles, *Nanotechnology*, 2009, 20, 405603.
- [Petit-Dominguez, 1997] Petit-Dominguez, M.D., Shen, H.; Heineman, W.R.; Seliskar, C.J., Electrochemical behavior of graphite electrodes modified by spin-coating with sol-gel entrapped ionomers, *Anal. Chem.*, 1997, 69, 703.
- [Pichot, 2008] Pichot, V., Comet, M.; Fousson, E.; Baras, C.; Senger, A.; Le Normand, F.; Spitzer, D., An efficient purification method for detonation nanodiamonds, *Diamond Relat. Mater.*, 2008, 17, 13.
- [Pingarrón, 2008] Pingarrón, J.M., Yáñez-Sedeño, P.; González-Cortés, A., Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors, *Electrochim. Acta*, 2008, 53, 5848.
- [Plegge, 2000] Plegge, V., Slama, M.; Suselbeck, B.; Wienke, D.; Spener, F.; Knoll, M.; Zaborosch, C., Analysis of ternary mixtures with a single dynamic microbial sensor and chemometrics using a nonlinear multivariate calibration, *Anal. Chem.*, 2000, 72, 2937.
- [Pokropivny, 2008] Pokropivny, V.V., Skorokhod, V.V., New dimensionality classifications of nanostructures, *Physica E*, 2008, 40, 2521.
- [Pokropivny, 2007] Pokropivny, V.V., Skorokhod, V.V., Classification of nanostructures by dimensionality and concept of surface forms engineering in nanomaterial science, *Mater. Sci. Eng. C*, 2007, 27, 990.
- [Politi, 2015] Politi, J., Rea, I.; Dardanoa, P.; De Stefano, L.; Gioffrè, M., Versatile synthesis of ZnO nanowires for quantitative optical sensing of molecular biorecognition, *Sens. Actuators, B*, 2015, 220, 705.

[Porretta, 1993] Porretta, S., Vicini, E., Changes in tomato pulp quality caused by lactic acid bacteria, *Int. J. Food Sci. Tech.*, 1993, 28, 611.

[Protasova, 2011] Protasova, L.N., Rebrov, E.V.; Choy, K.L.; Pung, S.Y.; Engels, V.; Cabaj, M.; Wheatley, A.E.H., ZnO based nanowires grown by chemical vapour deposition for selective hydrogenation of acetylene alcohols, *Cat. Sci. Tech.*, 2011, 1, 768.

[Pumera, 2010] Pumera, M., Ambrosi, A.; Bonanni, A.; Chng, E.L.K.; Poh, H.L., Graphene for electrochemical sensing and biosensing, *Trends Analyt. Chem.*, 2010, 29, 954.

[Putman, 1994] Putman, C.A.J., Van der Werf, K.O.; De Grooth, B.G.; Van Hulst, N.F.; Greve, J., Tapping mode atomic-force microscopy in liquid, *Appl.Phys.Lett.*, 1994, 64, 2454.

[Puzyr, 2007] Puzyr, A.P., Baron, A.V.; Purtov, K.V.; Bortnikov, E.V.; Skobelev, N.N.; Mogilnaya, O.A.; Bondar, V.S., Nanodiamonds with novel properties: A biological study, *Diamond Relat. Mater.*, 2007, 16, 2124.

R

[Raba, 1995] Raba, J., Mottola, H.A., Glucose oxidase as an analytical reagent, *Crit.REw.Anal.Chem*, 1995, 25, 1.

[Raghavan, 2012] Raghavan, R., Bechelany, M.; Parlinska, M.; Frey, D.; Mook, W.M.; Beyer, A.; Michler, J., Nanocrystalline-to-amorphous transition in nanolaminates grown by low temperature atomic layer deposition and related mechanical properties, *Appl. Phys. Lett.*, 2012, 100, 191912.

[Rahm, 2007] Rahm, A., Lorenz, M.; Nobis, T.; Zimmermann, G.; Grundmann, M.; Fuhrmann, B.; Syrowatka, F., Pulsed-laser deposition and characterization of ZnO nanowires with regular lateral arrangement, *Appl.Phys. A*, 2007, 88, 31.

[Randles, 1947] Randles, J.E.B., Kinetics of rapid electrode reactions, *Dis. Faraday Soc.*, 1947, 1, 11.

[Rassaei, 2014] Rassaei, L., Olthuis, W.; Tsujimura, S.; Sudhölter, E.J.R.; Van den Berg, A., Lactate biosensors: Current status and outlook, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2014, 406, 123.

[Reddy, 1987] Reddy, N.R.S., Manson, N.B.; Krausz, E.R., Two-laser spectral hole burning in a color center in diamond, *J. Lumin.*, 1987, 38, 46.

[Reviejo, 2000] Reviejo, A.J., Pingarron, J.M., Biosensores electroquímicos. una herramienta útil para el análisis medioambiental, alimentario y clínico, *Anales RSEQ*, 2000, 2, 5.

[Romero, 2008] Romero, M.R., Garay, F.; Baruzzi, A.M., Design and optimization of a lactate amperometric biosensor based on lactate oxidase cross-linked with polymeric matrixes, *Sens. Actuators, B*, 2008, 131, 590.

[Ryu, 2003] Ryu, Y.R., Lee, T.S., Properties of arsenic-doped p-type ZnO grown by hybrid beam deposition, *Appl. Phys. Lett.*, 2003, 83, 87.

S

[Saha D, 2018] Saha, D.; Negi, D.P.S., Spectroscopic investigations on the interaction of thioacetamide with ZnO quantum dots and application for its fluorescence sensing, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2018, 189, 516.

[Saha, 2011] Saha, S., Gupta, V., Influence of surface defects in ZnO thin films on its biosensing response characteristic, *J. Appl. Phys.*, 2011, 110, 064904.

[Saha, 2009] Saha, S., Arya, S.K.; Singh, S.P.; Sreenivas, K.; Malhotra, B.D.; Gupta, V., Zinc oxide–potassium ferricyanide composite thin film matrix for biosensing applications, *Anal. Chim. Acta*, 2009, 653, 212.

[Sarangi, 2015] Sarangi, S.N., Nozaki, S.; Sahu, S.N., ZnO nanorod-based non-enzymatic optical glucose biosensor, *J. Biomed. Nanotechnol.*, 2015, 11, 988.

[Sasidharan, 2013] Sasidharan, N.P., Chandran, P.; Khan, S.S., Interaction of colloidal zinc oxide nanoparticles with bovine serum albumin and its adsorption isotherms and kinetics, *Colloids Surfaces B*, 2013, 102, 195.

[Sato, 1997] Sato, S., Nozaki, S.; Morisaki, H., Photo-oxidation of germanium nanostructures deposited by the cluster-beam evaporation technique, *J. Appl. Phys.*, 1997, 81, 1518.

[Scholz, 2010] Scholz, F., Electroanalytical methods: Guide to experiments and applications, 2nd Ed. Springer, 2010.

[Schrand, 2007] Schrand, A.M., Huang, H.J.; Carlson, C.; Schlager, J.J.; Osawa, E.; Hussain, S.M.; Dai, L.M., Are diamond nanoparticles cytotoxic? *J. Phys. Chem. B*, 2007, 111, 2.

- [Schuhmann, 1990] Schuhmann, W., Lammert, R.; Uhe, B.; Schmidt, H., Polypyrrole, a new possibility for covalent binding of oxidoreductases to electrode surfaces as a base for stable biosensors, *Sens. Actuators, B*, 1990, 1, 537.
- [Scouten, 1995] Scouten, W.H., Luong, J.H.T.; Brown, R.S., Enzyme or protein immobilization techniques for applications in biosensor design, *Trends Biotechnol.*, 1995, 13, 178.
- [Selegård, 2010] Selegård, L., Khranovskyy, V.; Söderlind, F.; Vahlberg, C.; Åhrén, M.; Käll, P.; Yakimova, R., Biotinylation of ZnO nanoparticles and thin films: A two-step surface functionalization study, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2010, 2, 2128.
- [Shan, 2010] Shan, C., Yang, H.; Han, D.; Zhang, Q.; Ivaska, A.; Niu, L., Graphene/AuNPs/chitosan nanocomposites film for glucose biosensing, *Biosens. Bioelectron.*, 2010, 25, 1070.
- [Shan, 2009] Shan, C., Yang, H.; Song, J.; Han, D.; Ivaska, A.; Niu, L., Direct electrochemistry of glucose oxidase and biosensing for glucose based on graphene, *Anal. Chem.*, 2009, 81, 2378.
- [Sharma, 2003] Sharma, S.K., Sehgal, N.; Kumar, A., Biomolecules for development of biosensors and their applications, *Curr. Appl. Phys.*, 2003, 3, 307.
- [Shen, 2017] Shen, J., Zhang, D.; Zhang, F.; Gan, Y., AFM tip-sample convolution effects for cylinder protrusions, *Appl. Surf. Sci.*, 2017, 422, 482.
- [Shenderova, 2006] Shenderova, O., Petrov, I.; Walsh, J.; Grichko, V.; Grishko, V.; Tyler, T.; Cunningham, G., Modification of detonation nanodiamonds by heat treatment in air, *Diamond Relat. Mater.*, 2006, 15, 1799.
- [Shi, 2014] Shi, X., Gu, W.; Li, B.; Chen, N.; Zhao, K.; Xian, Y., Enzymatic biosensors based on the use of metal oxide nanoparticles, *Microchim. Acta*, 2014, 181, 1.
- [Shinbo, 1979] Shinbo, T., Sugiura, M.; Kamo, N., Potentiometric enzyme electrode for lactate, *Anal. Chem.*, 1979, 51, 100.
- [Shu, 2001] Shu, H.C., Wu, N.P., A chemically modified carbon paste electrode with D-lactate dehydrogenase and alanine aminotransferase enzyme sequences for D-lactic acid analysis, *Talanta*, 2001, 54, 361.

- [Singh, 2007] Singh, S.P., Arya, S.K.; Pandey, P.; Malhotra, B.D.; Saha, S.; Sreenivas, K.; Gupta, V., Cholesterol biosensor based on rf sputtered zinc oxide nanoporous thin film, *Appl. Phys. Lett.*, 2007, 91, 063901.
- [Sluyters-Rehbach, 1970] Sluyters-Rehbach, M., Sluyters, J.H., *Electroanalytical chemistry*, Ed. A.J. Bard, M. Dekker, 1970, 4.
- [Smart, 2006] Smart, S.K., Cassady, A.I.; Lu, G.Q.; Martin, D.J., The biocompatibility of carbon nanotubes, *Carbon*, 2006, 44, 1034.
- [Soccol, 1994] Soccol, C.R., Stonoga, V.I.; Raimbault, M., Production of L-lactic acid by *rhizopus* species, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 1994, 10, 433.
- [Sodzel, 2015] Sodzel, D., Khranovskyy, V.; Beni, V.; Turner, A.P.F.; Viter, R.; Eriksson, M.O.; Holtz, P., Continuous sensing of hydrogen peroxide and glucose via quenching of the UV and visible luminescence of ZnO nanoparticles, *Microchim. Acta*, 2015, 182, 1819.
- [Solin, 1970] Solin, S.A., Ramdas, A.K., Raman spectrum of diamond, *Phys. Rev. B*, 1970, 1, 1687.
- [Spitsyn, 2006] Spitsyn, B.V., Davidson, J.L.; Gradoboev, M.N.; Galushko, T.B.; Serebryakova, N.V.; Karpukhina, T.A.; Kulakova, I.I., Inroad to modification of detonation nanodiamond, *Diamond Relat. Mater.*, 2006, 15, 296.
- [Stankovich, 2007] Stankovich, S., Dikin, D.A.; Piner, R.D.; Kohlhaas, K.A.; Kleinhammes, A.; Jia, Y.; Wu, Y., Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide, *Carbon*, 2007, 45, 1558.
- [Stanley, 1985] Stanley, W.C., Gertz, E.W.; Wisneski, J.A.; Morris, D.L.; Neese, R.A.; Brooks, G.A., Systemic lactate kinetics during graded exercise in man, *Am J Physiol*, 1985, 249, E595.
- [Staskeviciene, 1991] Staskeviciene, S.L., Cenas, N.K.; Kulys, J.J., Reagentless lactate electrodes based on electrocatalytic oxidation of flavocytochrome b₂, *Anal. Chim. Acta*, 1991, 243, 167.
- [Steiner, 2011] Steiner, M., Duerkop, A.; Wolfbeis, O.S., Optical methods for sensing glucose, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, 40, 4805.
- [Steinmuller-Nethl, 2006] Steinmuller-Nethl, D., Kloss, F.R.; Najam-U-Haq, M.; Rainer, M.; Larsson, K.; Linsmeier, C.; Koehler, G., Strong binding of bioactive BMP-2 to nanocrystalline diamond by physisorption, *Biomaterials*, 2006, 27, 4547.

[Stephens, 1997] Stephens, S.K., Tothill, I.E.; Warner, P.J.; Turner, A.P.F., Detection of silage effluent pollution in river water using biosensors, *Wat. Res.*, 1997, 31, 41.

[Suhling, 2002] Suhling, K., Siegel, J.; Phillips, D.; French, P.M.W.; Lévêque-Fort, S.; Webb, S.E.D.; Davis, D.M., Imaging the environment of green fluorescent protein *Biophys. J.*, 2002, 83, 3589.

[Suman, 2005] Suman, S., Singhal, R.; Sharma, A.L.; Malthotra, B.D.; Pundir, C.S., Development of a lactate biosensor based on conducting copolymer bound lactate oxidase, *Sens. Actuators, B*, 2005, 107, 768.

[Sun, 1999] Sun, X.W., Kwok, H.S., Optical properties of epitaxially grown zinc oxide films on sapphire by pulsed laser deposition, *J. Appl. Phys.*, 1999, 86, 408.

T

[Tereshchenko, 2016] Tereshchenko, A., Optical biosensors based on ZnO nanostructures: Advantages and perspectives. A review, *Sens. Actuators, B*, 2016, 229, 664.

[Terrill, 2000] Terrill, R.H., Balss, K.M.; Zhang, Y.M.; Bohn, P.W., Dynamic monolayer gradients: Active spatiotemporal control of alkanethiol coatings on thin gold films, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 988.

[Tien, 2008] Tien, L.C., Pearton, S.J.; Norton, D.P.; Ren, F., Synthesis and microstructure of vertically aligned ZnO nanowires grown by high-pressure-assisted pulsed-laser deposition, *J. Mat. Sci.*, 2008, 43, 6925.

[Tiewcharoen, 2017] Tiewcharoen, S., Warakulwit, C.; Lapeyre, V.; Garrigue, P.; Fourier, L.; Elissalde, C.; Buffire, S., Anisotropic metal deposition on TiO₂ particles by electric-field induced charge separation, *Angew. Chem.*, 2017, 129, 1.

[Topoglidis, 2001] Topoglidis, E., Cass, A.E.G.; O'Regan, B.; Durrant, J.R., Immobilisation and bioelectrochemistry of proteins on nanoporous TiO₂ and ZnO films, *J. Electroanal. Chem.*, 2001, 517, 20.

[Turcheniuk, 2017] Turcheniuk, K., Mochalin, V., Biomedical applications of nanodiamond (review), *Nanotechnology*, 2017, 28, 252001.

U

[Ushizawa, 2002] Ushizawa, K., Sato, Y.; Mitsumori, T.; Machinami, T.; Ueda, T.; Ando, T., Covalent immobilization of DNA on diamond and its verification by diffuse reflectance infrared spectroscopy, *Chem. Phys. Lett.*, 2002, 351, 105.

V

[Vaamonde, 2000] Vaamonde, A.J.V., Ciencia e ingeniería de la superficie de los materiales metálicos, *Textos Universitarios. CSIC*, 2000, 31.

[Valentini, 2013] Valentini, F., Carbone, M.; Palleschi, G., Carbon nanostructured materials for applications in nano-medicine, cultural heritage, and electrochemical biosensors, *Anal.Bioanal.Chem.*, 2013, 405, 451.

[Valentini, 2008] Valentini, F., Palleschi, G., Nanomaterials and analytical chemistry, *Anal. Lett.*, 2008, 41, 479.

[Vamvakaki, 2007] Vamvakaki, V., Chaniotakis, N.A., Carbon nanostructures as transducers in biosensors, *Sens. Actuators, B*, 2007, 126, 193.

[Varley, 2014] Varley, T.S., Hirani, M.; Harrison, G.; Holt, K.B., Nanodiamond surface redox chemistry: Influence of physicochemical properties on catalytic processes, *Faraday Discuss.*, 2014, 172, 349.

[Vaseashta, 2005] Vaseashta, A., Dimova-Malinovska, D., Nanostructured and nanoscale devices, sensors and detectors, *Sci. Technol. Adv. Mat.*, 2005, 6, 312.

[Velasco-García, 2009] Velasco-García, M.N., Optical biosensors for probing at the cellular level: A review of recent progress and future prospects, *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 2009, 20, 27.

[Velasco-García, 2003] Velasco-García, M.N., Mottram, T., Biosensor technology addressing agricultural problems, *Biosyst. Eng.*, 2003, 84, 1.

[Viter, 2015a] Viter, R., Abou Chaaya, A.; Iatsunskyi, I.; Nowaczyk, G.; Kovalevskis, K.; Erts, D.; Miele, P., Tuning of ZnO 1D nanostructures by atomic layer deposition and electrospinning for optical gas sensor applications, *Nanotechnology*, 2015a, 26, 105501.

[Viter, 2015b] Viter, R., Balevicius, Z.; Abou Chaaya, A.; Baleviciute, I.; Tumenas, S.; Mikoliunaite, L.; Ramanavicius, A., The influence of localized plasmons on the optical properties of au/ZnO nanostructures, *J. Mater. Chem. C*, 2015b, 3, 6815.

- [Viter, 2014] Viter, R., Khranovskyy, V.; Starodub, N.; Ogorodniichuk, Y.; Gevelyuk, S.; Gertnere, Z.; Poletaev, N., Application of room temperature photoluminescence from ZnO nanorods for salmonella detection, *IEEE Sensors Journal*, 2014, 14, 2028.
- [Viter, 2012] Viter, R., Smyntyna, V.; Starodub, N.; Tereshchenko, A., Novel immune TiO₂ photoluminescence biosensors for leucosis detection, *Procedia Eng.*, 2012, 47, 338.
- [Vo-Dinh, 2000] Vo-Dinh, T., Cullum, B., Biosensors and biochips: Advances in biological and medical diagnostics, *Fresenius'J. Anal. Chem.*, 2000, 366, 540.
- [Vo-Dinh, 1987] Vo-Dinh, T., Tromberg, B.J.; Griffin, G.D.; Ambrose, K.R.; Sepaniak, M.J.; Gardenhire, E.M., Antibody-based fiber optics biosensor for the carcinogen benzo(a) pyrene, *Appl. Spectrosc.*, 1987, 41, 735.
- [Volpe, 1995] Volpe, G., Moscone, D.; Compagnone, D.; Palleschi, G., *In vivo* continuous monitoring of L-lactate coupling subcutaneous microdialysis and an electrochemical biocell, *Sens. Actuators, B*, 1995, 24, 138.

W

- [Walcarius, 2001] Walcarius, A., Electroanalysis with pure, chemically modified, and sol-gel-derived silica-based materials, *Electroanal.*, 2001, 13, 701.
- [Wanekaya, 2006] Wanekaya, A.K., Chen, W.; Myung, N.V.; Mulchandani, A., Nanowire-based electrochemical biosensors, *Electroanal.*, 2006, 18, 533.
- [Wang D., 2009] Wang, D., Chen, L., Facile direct electron transfer in glucose oxidase modified electrodes, *Electrochim. Acta*, 2009, 54, 4316.
- [Wang H.D., 2011] Wang, H.D., Niu, C.H.; Yang, Q.Q.; Badea, I., Study on protein conformation and adsorption behaviors in nanodiamond particle-protein complexes, *Nanotechnology*, 2011, 22, 145703.
- [Wang J., 2015] Wang, J., Shi, A.; Fang, X.; Han, X.; Zhang, Y., An ultrasensitive supersandwich electrochemical DNA biosensor based on gold nanoparticles decorated reduced graphene oxide, *Anal. Biochem.*, 2015, 469, 71.
- [Wang J., 2008] Wang, J., Electrochemical glucose biosensor, *Chem. Rev.*, 2008, 108, 814.
- [Wang J., 2005] Wang, J., Nanomaterial-based electrochemical biosensors, *Analyst*, 2005, 130, 421.

- [Wang J., 1999] Wang, J., Towards genoelectronics: Electrochemical biosensing of DNA hybridization, *Chem. Eur. J.*, 1999, 5, 1681.
- [Wang W., 2009] Wang, W., Wu, T.; Chou, T.; Chen, Y., A ZnO nanorod-based SAW oscillator system for ultraviolet detection, *Nanotechnology*, 2009, 20, 135503.
- [Wang X., 2004] Wang, X., Ding, Y.; Summers, C.J.; Wang, Z.L., Large-scale synthesis of six-nanometer-wide ZnO nanobelt, *J. Phys. Chem. B*, 2004, 108, 8773.
- [Wang Y., 2014] Wang, Y., Li, H.; Kong, J., Facile preparation of mesocellular graphene foam for direct glucose oxidase electrochemistry and sensitive glucose sensing, *Sens. Actuators, B*, 2014, 193, 708.
- [Warheit, 2006] Warheit, D.B., What is currently known about the health risks related to carbon nanotube exposures? *Carbon*, 2006, 44, 1064.
- [Wei, 2006] Wei, A., Sun, X.W.; Wang, J.X.; Lei, Y.; Cai, X.P.; Li, C.M.; Dong, Z.L., Enzymatic glucose biosensor based on ZnO nanorod array grown by hydrothermal decomposition, *Appl. Phys. Lett.*, 2006, 89, 123902.
- [Wei, 2010] Wei, Y., Li, Y.; Liu, X.; Xian, Y.; Shi, G.; Jin, L., ZnO nanorods/au hybrid nanocomposites for glucose biosensor, *Biosens. Bioelectron.*, 2010, 26, 275.
- [Wellner, 1967] Wellner, D., Flavoproteins, *Annual Review of Biochemistry*, 1967, 36, 669.
- [Wilhelm, 2014] Wilhelm, S., Del Barrio, M.; Heiland, J.; Himmelstoß, S.F.; Galbán, J.; Wolfbeis, O.S.; Hirsch, T., Spectrally matched upconverting luminescent nanoparticles for monitoring enzymatic reactions, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2014, 6, 15427.
- [Williams G., 2009] Williams, G., Kamat, P.V., Graphene-semiconductor nanocomposites: Excited-state interactions between ZnO nanoparticles and graphene oxide, *Langmuir*, 2009, 25, 13869.
- [Williams O.A., 2010] Williams, O.A., Hees, J.; Dieker, C.; Jäger, W.; Kirste, L.; Nebel, C.E., Size-dependent reactivity of diamond nanoparticles, *ACS Nano*, 2010, 4, 4824.
- [Wooten, 2014] Wooten, M., Karra, S.; Zhang, M.; Gorski, W., On the direct electron transfer, sensing, and enzyme activity in the glucose oxidase/carbon nanotubes system, *Anal. Chem.*, 2014, 86, 752.
- [Wu, 2007] Wu, Y.L., Lim, C.S.; Fu, S.; Tok, A.I.Y.; Lau, H.M.; Boey, F.Y.C.; Zeng, W.T., Surface modifications of ZnO quantum dots for bio-imaging, *Nanotechnology*, 2007, 18, 215604.

X

[Xia, 2003] Xia, Y.N., Yang, P.D.; Sun, Y.G.; Wu, Y.Y.; Mayers, B.; Gates, B.; Yin, Y.D., One-dimensional nanostructures: Synthesis, characterization and applications, *Adv. Mater.*, 2003, 15, 353.

[Xing, 2010] Xing, S.X., Feng, Y.H.; Tay, Y.Y.; Chen, T.; Xu, J.; Pan, M.; He, J.T., Reducing the symmetry of bimetallic Au@Ag nanoparticles by exploiting eccentric polymer shells, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132, 9537.

Y

[Yakimova, 2012] Yakimova, R., Selegard, L.; Khranovskyy, V.; Pearce, R.; Spetz, A.L.; Uvdal, K., ZnO materials and surface tailoring for biosensing. *Frontiers in bioscience (Elite edition)* 4, 2012, 4, 254.

[Yang P., 2002] Yang, P., Yan, H.; Mao, S.; Russo, R.; Johnson, J.; Saykally, R.; Morris, N., Controlled growth of ZnO nanowires and their optical properties, *Adv. Func. Mater.*, 2002, 12, 323.

[Yang Q.L., 1998] Yang, Q.L., Atanasov, P.; Wilkins, E., An integrated needle-type biosensor for intravascular glucose and lactate monitoring, *Electroanal.*, 1998, 10, 752.

[Yashina, 2010] Yashina, E.I., Borisova, A.V.; Karyakina, E.E.; Shchegolikhina, O.I.; Vagin, M.Y.; Sakharov, D.A.; Tonevitsky, A.G., Sol-gel immobilization of lactate oxidase from organic solvent: Toward the advanced lactate biosensor, *Anal. Chem.*, 2010, 82, 1601.

[Yeap, 2008] Yeap, W.S., Tan, Y.Y.; Loh, K.P., Using detonation nanodiamond for the specific capture of glycoproteins, *Anal. Chem.*, 2008, 80, 4659.

[Yi, 2005] Yi, G.C., Wang, C.; Park, W.I., ZnO nanorods: Synthesis, characterization and applications, *Semicond. Sci. Technol.*, 2005, 20, S22.

[Yogeswaran, 2008] Yogeswaran, U., Chen, S., Recent trends in the application of carbon nanotubes–polymer composite modified electrodes for biosensors: A review, *Anal. Lett.*, 2008, 41, 210.

[Yuan, 2010] Yuan, Q., Hein, S.; Misra, R.D.K., New generation of chitosan-encapsulated ZnO quantum dots loaded with drug: Synthesis, characterization and *in vitro* drug delivery response, *Acta Biomater.*, 2010, 6, 2732.

Z

[Zanini, 2010] Zanini, V.P., López de Mishima, B.; Labbè, P.; Sol, V., An l-lactate amperometric enzyme electrode based on l-lactate oxidase immobilized in a laponite gel on a glassy carbon electrode. application to dairy products and red wine, *Electroanal.*, 2010, 22, 946.

[Zaydan, 2004] Zaydan, R., Dion, M.; Boujtita, M., Development of a new method, based on a bioreactor coupled with an L-lactate biosensor, toward the determination of a nonspecific inhibition of L-lactic acid production during milk fermentation, *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, 8.

[Zhan, 2002] Zhan, W., Alvarez, J.; Crooks, R.M., Electrochemical sensing in microfluidic systems using electrogenerated chemiluminescence as a photonic reporter of redox reactions, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124, 13265.

[Zhang X., 2009] Zhang, X., Qin, G.Q.; Cui, D., Recent advances in nanotechnology applied to biosensors, *Sensors*, 2009, 9, 1033.

[Zhang Y., 2012] Zhang, Y., Ram, M.K.; Stefanakos, E.K.; Goswami, D.Y., Synthesis, characterization and applications of ZnO nanowires, *J. Nanomater.*, 2012, 1.

[Zhao D., 2013] Zhao, D., Song, H.; Hao, L.; Liu, X.; Zhang, L.; Lv, Y., Luminescent ZnO quantum dots for sensitive and selective detection of dopamine, *Talanta*, 2013, 107, 133.

[Zhao Y.D., 2002] Zhao, Y.D., Zhang, W.D.; Chen, H.; Luo, Q.M.; Li, S.F.Y., Direct electrochemistry of horseradish peroxidase at carbon nanotube powder microelectrode, *Sens. Actuators, B*, 2002, 87, 168.

[Zhou, 2007] Zhou, J., Zhao, F.; Wang, Y.; Zhang, Y.; Yang, L., Size controlled synthesis of ZnO nanoparticles and their photoluminescence properties, *J. Lumin.*, 2007, 122-123, 195.

[Zhu J.T., 2007] Zhu, J.T., Shi, C.G.; Xu, J.J.; Chen, H.Y., Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin on undoped nanocrystalline diamond modified glassy carbon electrode, *Bioelectrochemistry*, 2007, 71, 243.

[Zhu L., 2013] Zhu, L., Xu, L.; Tan, L.; Tan, H.; Yang, S.; Yao, S., Direct electrochemistry of cholesterol oxidase immobilized on gold nanoparticles-decorated multiwalled carbon nanotubes, *Talanta*, 2013, 106, 192.

[Zou, 2011] Zou, H.Y., Yan, D.Q.; Mohi, G., Differential biological activity of disease-associated JAK2 mutants, FEBS Lett., 2011, 585, 1007.



PUBLICACIONES

Esta tesis doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

- Briones, M., Casero, E., Petit-Domínguez, M.D., Ruiz, M.A., Parra-Alfambra, A.M., Pariente, F., Lorenzo, E., Vázquez, L., Diamond nanoparticles based biosensors for efficient glucose and lactate determination, *Biosensors & Bioelectronics*, 2015, 68, 521–528, doi.org/10.1016/j.bios.2015.01.044.
- Briones, M., Casero, E., Vázquez, L., Pariente, F., Lorenzo, E., Petit-Domínguez, M.D., Diamond nanoparticles as a way to improve electron transfer in sol gel L-lactate biosensing platforms, *Analytica Chimica Acta*, 2016, 908, 141-149, doi.org/10.1016/j.aca.2015.12.029.
- Briones, M., Petit-Domínguez, M.D., Parra-Alfambra, A.M., Vázquez, L., Pariente, F., Lorenzo, E., Casero, E., Electrocatalytic processes promoted by diamond nanoparticles in enzymatic biosensing devices, *Bioelectrochemistry*, 2016, 111, 93–99, doi.org/10.1016/j.bioelechem.2016.05.007.